



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y
ECOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**EMPLEO DEL ABEJORRO “BOMBUS
TERRESTRIS, L.” EN LA POLINIZACIÓN DE
CULTIVOS HORTÍCOLAS PROTEGIDOS DEL
SURESTE ESPAÑOL PARA MEJORAR LA
PRODUCTIVIDAD Y CALIDAD DE LA
COSECHA**

**PRESENTADA POR:
ANA S. ROLDÁN SERRANO**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JOSÉ MANUEL GUERRA SANZ
DRA. DÑA. MÓNICA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ**

JAÉN, 6 DE JUNIO DE 2014

ISBN 978-84-8439-851-6

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Biología Animal, Biología
Vegetal y Ecología



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural



Tesis Doctoral

**EMPLEO DEL ABEJORRO “*Bombus terrestris*, L.” EN
LA POLINIZACIÓN DE CULTIVOS HORTÍCOLAS
PROTEGIDOS DEL SURESTE ESPAÑOL PARA
MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD Y CALIDAD DE LA
COSECHA**

Doctoranda: D^a. Ana S. Roldán Serrano

UNIVERSIDAD DE JAÉN



Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

En colaboración con:



**Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL**

TESIS DOCTORAL

**EMPLEO DEL ABEJORRO “*Bombus terrestris*, L.” EN
LA POLINIZACIÓN DE CULTIVOS HORTÍCOLAS
PROTEGIDOS DEL SURESTE ESPAÑOL PARA
MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD Y CALIDAD DE LA
COSECHA**

Doctoranda:

D^a. Ana S. Roldán Serrano

Junio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Biología Animal, Biología
Vegetal y Ecología

**EMPLEO DEL ABEJORRO “*Bombus terrestris*, L.” EN LA
POLINIZACIÓN DE CULTIVOS HORTÍCOLAS
PROTEGIDOS DEL SURESTE ESPAÑOL PARA MEJORAR
LA PRODUCTIVIDAD Y CALIDAD DE LA COSECHA**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Biología

por:

D^a ANA S. ROLDÁN SERRANO

Fdo.: Ana S. Roldán Serrano

Visado en Almería, a 11 de abril de 2014

Director

Dr. D. José Manuel Guerra Sanz
Investigador del IFAPA

Codirectora

Dra. D^a. Mónica González Fernández
Investigadora de la Estación Experimental
Las Palmerillas de Cajamar-Caja Rural

El trabajo que aquí se presenta ha sido realizado en las instalaciones del Departamento de Biotecnología de la Polinización del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía (IFAPA), centro La Mojonera (Almería).

Esta tesis ha sido realizada en el marco de dos proyectos de investigación:

1.- “Polinización con abejorros en cultivo de otoño-invierno de pimiento dulce bajo invernadero en Almería y diseño de una nueva colmena”, financiado por el Programa PROFIT, con una duración de 3 años (2001-2003) y como entidades participantes: IFAPA - centro La Mojonera, D.A.P. y Agrobío, S.L.

2.- “Calidad de producción de calabacín, mediante polinización por abejorros, en cultivo de otoño-invierno bajo invernadero de plástico”, financiado por INIA, con una duración de 3 años (2003-2006) y como entidades participantes: IFAPA - centro La Mojonera, Universidad de Jaén y Agrobío, S.L.

Los resultados descritos en esta tesis doctoral han sido publicados y presentados en las siguientes revistas, congresos nacionales e internacionales y han dado lugar a la obtención de una patente:

Artículos en revistas científicas

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2004). Dynamics and sugar composition of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) nectar. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79 (5): 717-722.

Mena-Granero, A., Guerra-Sanz, J.M., Egea-González, F.J., Martínez-Vidal, J.L., Dornhaus, A., Ghani, J., Roldán-Serrano, A. y Chittka, L. (2005). Chemical compounds of the foraging recruitment pheromone in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 92: 371-374.

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2005). Reward attractions of zucchini flowers (*Cucurbita pepo*, L.) to Bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *European Journal of Horticultural Science*, 70 (1): 23-28.

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2006). Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination. *Scientia Horticulturae*, 110: 160-166.

Artículos en revistas de divulgación

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2004). Polinización de pimiento “California” en invernadero. *Revista Horticultura*, 177: 74-75.

Capítulos de libros

Vila-Rifá, E., Roldán-Serrano, A.S., Beltrán-Morales, F.D y Soler-Rodríguez, A. (2009a). Estado de la tecnología. Sistemas Biológicos Auxiliares. En: *Invernaderos de Plástico*, nº 26. Fundación COTEC para la Innovación Tecnológica, Madrid, 28-31.

Vila-Rifá, E., Roldán-Serrano, A.S., Beltrán-Morales, F.D y Soler-Rodríguez, A. (2009b). Oportunidades tecnológicas. Sistemas Biológicos Auxiliares. En: *Invernaderos de Plástico*, nº 26. Fundación COTEC para la Innovación Tecnológica, Madrid, 54-57.

Beltrán, F.D., Parra, A., Roldán, A., Soler, A. y Vila, E. (2010). Pasado, presente y futuro del control integrado de plagas en la provincia de Almería. En: *Perspectivas del Control Biológico en Agricultura bajo plástico. Cuadernos de Estudios Agroalimentarios (CEA)*, vol. 1. Fundación Cajamar, Almería, 27-43.

Patentes

Egea-González, F.J., Guerra-Sanz, J.M., Martínez-Vidal, J.L., Roldán-Serrano, A.S., Dornhaus, A., Chittka, L. y Mena-Granero, A. (2005). *Novel compounds to stimulate pollination activity of commercial bumblebees hives*. N. de solicitud: P05123252. Entidad titular: Queen Mary University of London. País de prioridad: Reino Unido y extendido a España. Fecha de concesión: 16/06/05.

Egea-González, F.J., Guerra-Sanz, J.M., Martínez-Vidal, J.L., Roldán-Serrano, A.S., Dornhaus, A., Chittka, L. y Mena-Granero, A. (2006). *Compositions comprising eucalyptol and/or ocimene and/or farnesol for use as bumblebee pheromones*. N. de solicitud: PCT/GB2006/002206. Entidad titular: Queen Mary, University of London. Patente Internacional. Fecha de concesión: 16/06/06.

Aportaciones a congresos

Roldán-Serrano, A.S., Ortuño-Izquierdo M.J. y Guerra-Sanz, J.M. (2002a). Flower attractiveness to bumblebees (*Bombus terrestris*, L.) in zucchini (*Curcubita pepo*, L.). En: Maynard, D.N. (ed.). *Cucurbitaceae 2002*. Naples, Florida, 343-348.

Roldán-Serrano, A.S., Ortuño-Izquierdo M.J. y Guerra-Sanz, J.M. (2002b). Pollination of *Capsicum annuum* (L.) (sweet pepper) flowers by bumblebee visits during autumn-winter crop under greenhouse conditions. En: *Gordon*

Research Conferences: "Floral Scent, Biology, Chemistry and Evolution of". Ventura, California, 4.

Mena-Granero, A., González-Rodríguez, M.J., Garrido-Frenich, A., Arrebola-Liébanas, F.J., Egea-González, F.J., Martínez-Vidal, J.L., Guerra-Sanz, J.M. y Roldán-Serrano, A. (2003). Análisis mediante la técnica del "Headspace-SPME" de volátiles de flores de calabacín (*Cucurbita pepo*, L.). *Actas de Horticultura*, 39: 414-415.

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2003). Efecto de la polinización con abejorros (*Bombus terrestris*, L.), en invernadero, sobre la calidad de pimiento (*Capsicum annuum*, L.) tipo California. *Actas de Horticultura*, 39: 425-427.

Guerra-Sanz, J.M. y Roldán-Serrano, A. (2004a). Activity of Bumblebees (*Bombus terrestris*, L.) on the pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) flowers and fruit set. En: *17th International Pepper Conference*, Naples, Florida, 23.

Guerra-Sanz, J.M. y Roldán-Serrano, A. (2004b). Dynamics and sugar composition of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) nectar. En: *17th International Pepper Conference*. Naples, Florida, 24.

Guerra Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A.S. y Mena-Granero, A. (2004). Pollination of zucchini culture by bumblebees: Advance of results of quality production. En: Lebeda, A. y Paris, H.S. (eds.). *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Olumouc (República Checa), 75-77.

Mena-Granero, A., Guerra-Sanz, J.M., Martínez-Vidal, J.L., Garrido-Frenich, A., Roldán-Serrano, A. y Egea-González, F.J. (2004). Sugars and volatiles composition of nectar of zucchini flowers. En: Lebeda, A. y Paris, H.S. (eds.). *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Olumouc (República Checa), 69-74.

Guerra-Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A.S. y Mena-Granero, A. (2005). Pollination in extra-early horticulture crops of Almería greenhouses. En: *39th Apimondia International Apicultural Congress*, Dublín, 66.

Guerra-Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A.S., Mena-Granero, A. y Fernández-López, C. (2005). Pollination in extra-early horticulture crops of Almería greenhouse framework. En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 97-112.

Mena-Granero, A., Guerra-Sanz, J.M., Egea-González, F.J., Martínez Vidal, J.L., Dornhaus, A., Ghani, J., Roldán-Serrano, A. y Chittka, L. (2005). (2006). Chemical compounds of the food alert and recruitment pheromone in the bumblebee *Bombus terrestris* and its physiological role. En: *22nd Annual Meeting International Society of Chemical Ecology*. Barcelona, 136.

Roldán-Serrano, A., Guerra-Sanz, J.M., Mena-Granero, A., Egea-González, F.J., Martínez-Vidal, J.L. (2005). Are the bumblebees able to choose nutritive pollen? En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 113-121.

Guerra-Sanz, J.M., Mena Granero, A., Egea-González, F.J., Martínez Vidal, J.L., Dornhaus, A., Ghani, J., Roldán-Serrano, A. y Chittka, L. (2006a). Food-Alert and recruitment pheromone in the bumble bee *Bombus terrestris*. En: *XV Congress IUSSI Proceedings*, Washington D.C., 100.

Guerra-Sanz, J.M., Mena-Granero, A., Egea-González, F.J., Martínez-Vidal, J.L., Dornhaus, A., Ghani, J., Roldán-Serrano, A. y Chittka, L. (2006b). Food alert and aggregation pheromone of bumblebee. En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *Second Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 102-111.

Guerra-Sanz, J.M. y Roldán-Serrano, A. (2007). Feromona larval de abejas (*Apis mellifera*) en la producción de sandía (*Citrullus lanatus*) triploide en invernadero. En: *XI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*, Albacete, 1D02.

Guerra-Sanz, J.M., Mena-Granero, A. y Roldán-Serrano, A. (2007). Calidad del calabacín en un cultivo de invernadero mediante polinización con abejorros. En: *XI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*, Albacete, 1D13.

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2007). Polinización con abejorros en cultivo de pimiento en invernaderos de Almería. En: *XI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas*, Albacete, 1D03.

Guerra-Sanz, J.M. y Roldán Serrano, A. (2008). Influence of honey bees brood pheromone on the production of triploid watermelon. En: Pitrat, M. (ed). *Cucurbitaceae 2008. Proceedings of the 9th EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*, Avignon, 385-389.

Guerra-Sanz, J.M. y Roldán-Serrano, A. (2009). Influencia de la feromona de larvas de abeja en la producción de sandías triploides. En: *Actas de Horticultura*, 54: 468-471.

Roldán, A., Sacot, P., Parra, A., Ruíz, L. y Funes, S. (2011). Polinización con abejorros en calabacín: una alternativa a las fitohormonas. En: *Libro de Resúmenes del VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada*. Joxman Editores, Baeza, 106.

Guerra-Sanz, J.M. y Roldán-Serrano, A. (2013). Feromona de larvas de abeja en la producción de sandías triploides. En: *III Jornadas Internacionales sobre feromonas, trampas y control biológico: herramientas para la gestión integrada*. Cartagena, 2.

AGRADECIMIENTOS

Me ha costado más de lo que esperaba pero, por fin, ha llegado la hora de escribir unas palabras de agradecimiento para todos aquellos que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

Cuando Carlos Fernández, catedrático de Botánica de la Universidad de Jaén, me propuso pedir una beca de sólo tres meses en Almería, nunca pensé que estaría tanto tiempo en esta ciudad; a pesar de que M^a Dolores, una gran amiga de mi madre, no dudó en afirmarlo.

Durante este tiempo, de la mano de José Manuel Guerra, he aprendido sobre agricultura, invernaderos, polinización, polinizadores y otros muchos temas que en mi formación académica no tuve oportunidad de conocer en profundidad. A él le doy las gracias por hacerme pensar como investigadora, por plantearme “¿Qué quieres hacer?”, por enseñarme a tener iniciativas y, creo que lo más importante, por tener confianza en mí y en mi capacidad. Sin embargo, la oportunidad de trabajar con unos “bichos” fascinantes y entrañables no hubiera sido posible sin los proyectos que han dado lugar a esta tesis, gracias a la colaboración de la empresa Agrobío S.L.

A Mónica González, por aceptar la responsabilidad de la codirección sin reservas, por ser amiga y aconsejarme con tan buen criterio en los momentos difíciles, que han sido unos pocos durante estos dos últimos años. ¿Quién nos iba a decir que una pequeña conversación en la entrada del CIFA, junto a Montse y Luz Ángela, nos haría llegar hasta aquí?

A mi querida M^a Victoria Gómez, por elegirme cuando pedí ser su alumna colaboradora, por ser mi mentora en mis primeros pasos como investigadora. Es un privilegio contar siempre con su amistad y consejos. Su modo de ver la vida me ha calado tanto en lo profesional como en lo personal.

Mi inmensa gratitud a Carmen Cárdenas, sin su dedicación, cariño y apoyo aún hoy estaría contando semillas y las horas en el invernadero se me hubieran hecho eternas.

Ahora el turno para todos aquellos que, de algún modo, me han ayudado en la realización de este trabajo: a los directores del IFAPA - centro La Mojonera,

D. José Luís Hernández Sánchez y D. José Gabriel López Segura, y a todos los departamentos por abrirme las puertas de sus laboratorios siempre que lo necesité, en especial, a M^a Luz Segura y a su equipo, que me sufrió durante tres años cuando iba a medir conductividad y pH, y a M^a del Mar Téllez y a su equipo, por sus consejos y su tiempo, con su equipo fotográfico pude realizar fotografías de gran calidad; a Sierra Bacarizo, encargada de la mejora de pimiento de la empresa Syngenta Seeds, S.A., por el suministro de semillas y su ayuda desinteresada, y a sus compañeros del centro de Torrepacheco (Murcia); a los directores del Laboratorio de Sanidad Vegetal de Almería, José Carlos y María, y a todo su personal, en especial al grupo de Residuos y al de Entomología; a Javier Bonilla, por los dibujos a carboncillo que ilustran esta tesis; a Michiel de Both (Keygene-Wageningen), amigo desde hace muchos años de José Manuel, por facilitarme bibliografía; a Adriaan van Doorn y a Don Griffiths, ambos de una gran calidad profesional y humana, con los que he tenido el privilegio de trabajar.

Gracias a todos mis compañeros del IFAPA, las conversaciones de pasillo y las bromas hicieron que mi trabajo fuera realmente agradable.

A todos y cada uno de mis compañeros de Agrobío, S.L. En especial a M^a José Ortuño, por su asesoramiento al inicio del proyecto; a Miguel Egea, por iniciarme en la apicultura y en el manejo de la producción de abejorros, un mundo realmente fascinante y del que aún me queda mucho que aprender; a Pepe Maldonado, por hacerme sonreír cuando veía que mi cara reflejaba agobio. Ahora llamarme “doctora” tiene más sentido.

A mis compañeros de la facultad, hoy grandes profesionales, con los que compartí agradables charlas sobre nuestros respectivos trabajos durante mis cortas estancias.

A mis queridos colegas y amigos del grupo de investigación AGR-222 de la Universidad de Almería, por su apoyo y ayuda desinteresada durante tantos años.

Una mención especial a mis queridos amigos M^a Ángeles Viciano, M^a del Mar Ogea, Luz Ángela Chaves, Víctor Martínez, Jordi Moreno, Isa Ruíz, Loles Alcázar, Lola Pérez, David Beltrán, “Mariquita”, Inma Martínez, Alejo Soler, Anabel Parra, Alex Torres, “Sandrita”, Fernando Yélamos y Ángeles López, cada uno me ha proporcionado horas de alegría y relax cuando me sentía desanimada o frustrada. ¡Gracias de corazón!

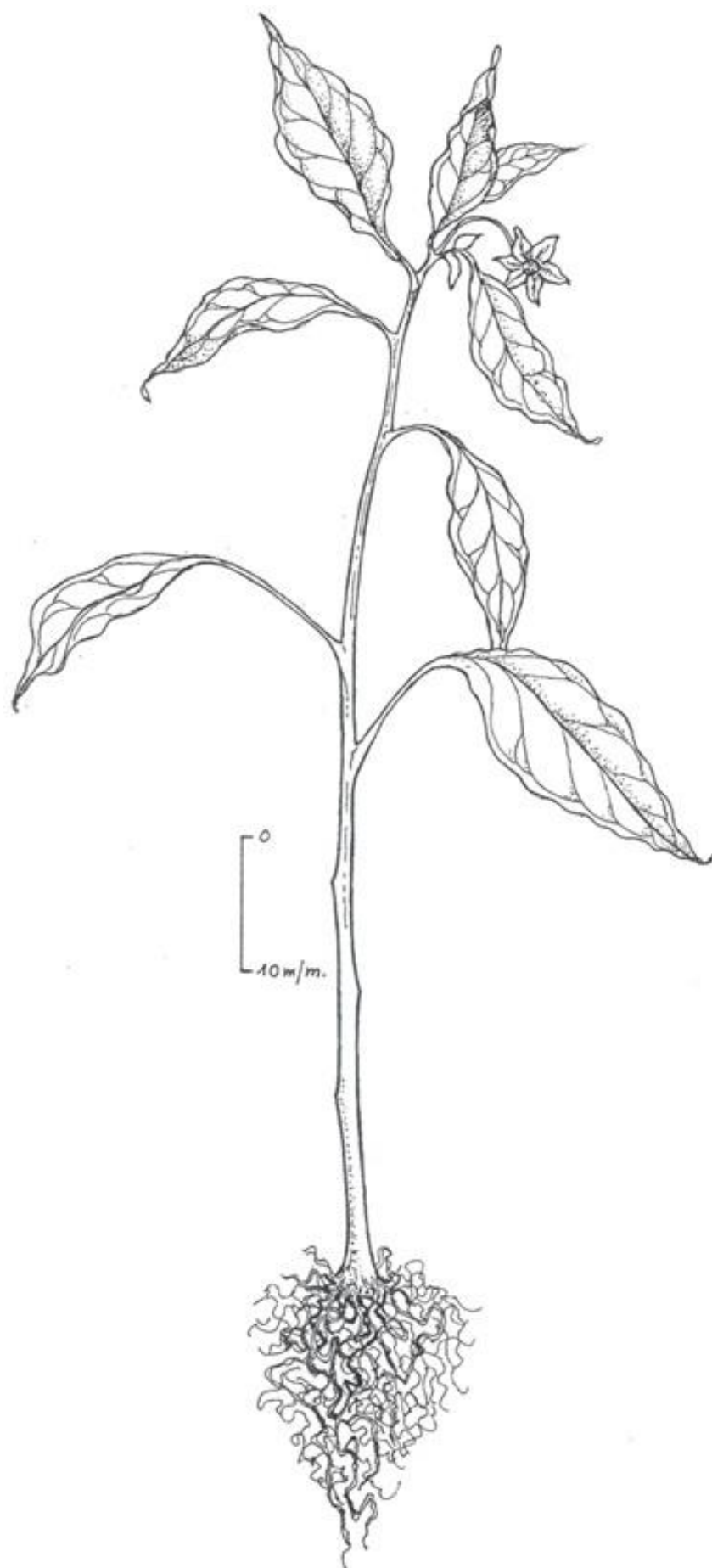
Finalmente, y si he olvidado a alguien que me disculpe, quiero expresar mi sincero agradecimiento a Andrés que, desde que nos conocimos, me ha regalado dosis de risa y paciencia para sobrellevar la rutina, las dificultades de los últimos años y apaciguar mis temores. A mi familia, mis padres Juan y Ana, mi querida hermana Mabel y mi tío Diego, por vuestro consuelo, aliento y tiempo cuando parecía que todo se derrumbaba y no encontraba sentido a mi existencia ni a mi trabajo. Ahora ya puedo contestar a vuestra pregunta: “Sí, ya he terminado”.

A mi familia y a mis “amarillos”

*"Lo poco que he aprendido carece de valor, comparado
con lo que ignoro y no desespero en aprender."*

(Francis Descartes)

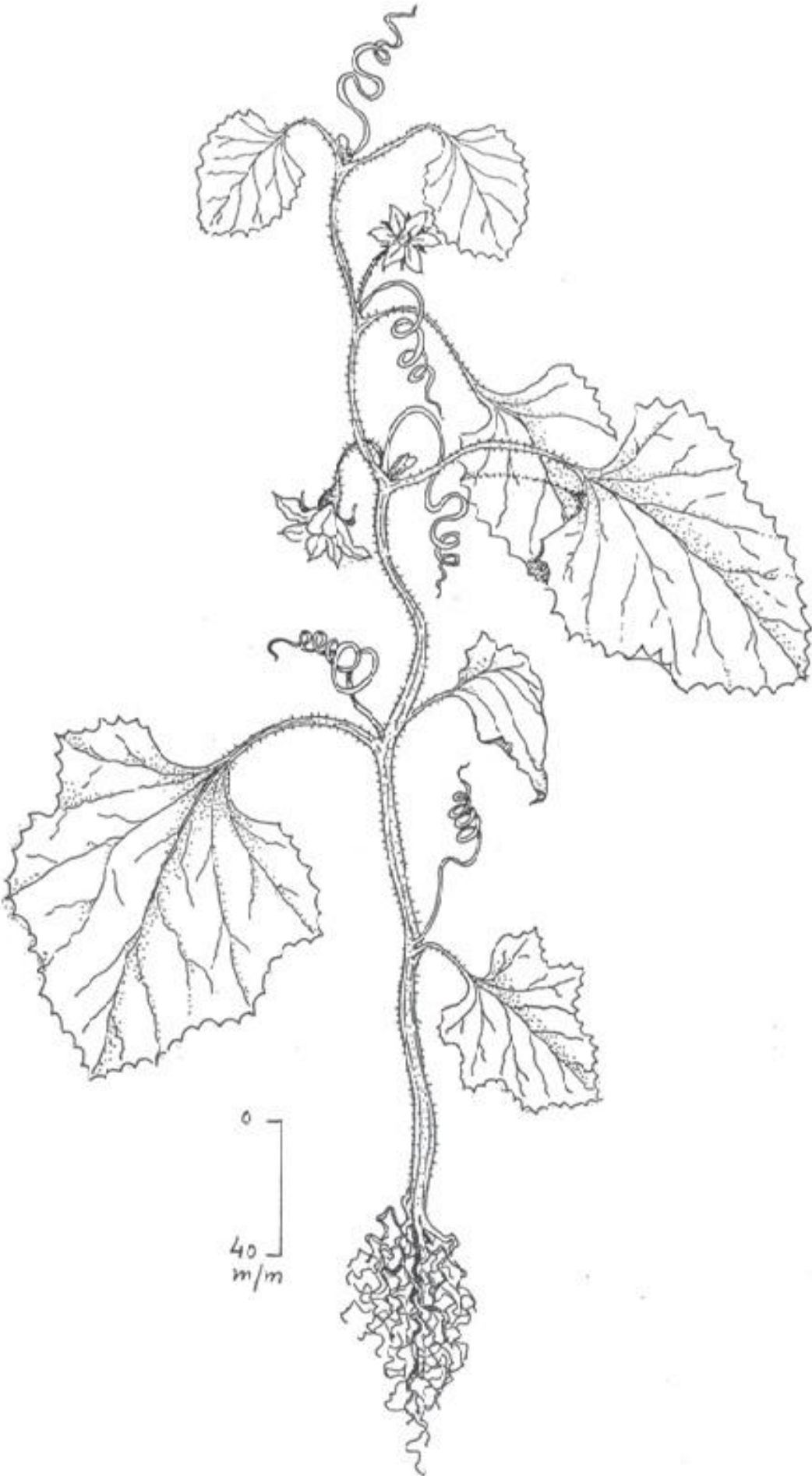
ÍNDICE



ÍNDICE

Introducción	1
1. La horticultura protegida en el sureste español.	3
2. La polinización en los cultivos protegidos.	11
3. El abejorro como vector de polinización asistida.....	21
Interés y objetivos	33
Artículos.....	43
1. Reward attractions of zucchini flowers (<i>Cucurbita pepo</i> , L.) to bumblebees (<i>Bombus terrestris</i> , L).....	45
2. Dynamics and sugar composition of sweet pepper (<i>Capsicum annuum</i> , L.) nectar.....	53
3. Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination.....	61
Resultados y discusión	71
Conclusiones.....	85
Bibliografía	89
Anexo.....	111

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. LA HORTICULTURA PROTEGIDA EN EL SURESTE ESPAÑOL

La palabra horticultura es originaria de las palabras latinas *hortus* (huerta, planta o jardín) y *cultura* (cultivo). Tiene su origen en el inicio de la vida sedentaria, cuando el hombre comenzó a cultivar la tierra, y con el transcurso del tiempo, se ha hecho cada vez más importante debido a factores como el aumento demográfico, la mejor calidad de vida o el aumento de la demanda de productos. Según Janick (1972), se define como: “La rama de la agricultura que está relacionada con el uso intensivo de plantas cultivadas por el hombre, con el fin de alimentarse y obtener tanto beneficios estéticos como medicinales”. En este sentido, la Sociedad Internacional para las Ciencias Hortícolas (ISHS) engloba, dentro de esta actividad, cinco áreas de estudio:

- Floricultura, que incluye producción y comercialización de plantas y flores cortadas con fines ornamentales.
- Olericultura, que engloba la producción y comercialización de las hortalizas, sean de hoja, raíz, tubérculo o fruto.
- Fruticultura, que incluye producción y comercialización de las frutas.
- Aromáticas, medicinales y perfumíferas.
- Fisiología de la post-cosecha, que comprende el mantenimiento de la calidad y prevención de la degradación y pérdida de los productos cosechados.

El cultivo de hortalizas representa un papel importante dentro de la horticultura mundial. En el año 2010, se cultivaron 54.593.391 ha, con una producción de 1.036 millones de toneladas (mt) y un volumen de exportaciones en torno a los 1,35 mt. Cabe señalar que, desde el año 2001, se ha producido un incremento de la superficie del 12,39%, mientras que la producción aumentó un 22,33%. Estas cifras apuntan a una mejora en el aprovechamiento de las zonas hortícolas cultivadas y a una mayor tecnificación de las explotaciones. En este sentido, tanto Europa como América, continentes con mayor industrialización, aumentaron sus producciones un 1,35% y un 5,32%, aun cuando se redujo el número de hectáreas cultivadas, -11,97% y -0,58%, respectivamente (**cuadro 1**). El tomate es la primera hortaliza producida a nivel mundial, seguida de la sandía y

de varias especies de la familia de las cucurbitáceas, el pimiento en fresco, etc. (**cuadro 2**).

Cuadro 1. Superficie cultivada (ha) y producción (t) de hortalizas frescas, a nivel mundial. Años 2001 y 2010 (fuente: FAOSTAT, 2012).

Superficie total (ha)			
Continentes	2001	2010	Incremento entre años (%)
Asia	33.675.311	39.608.251	14,98
África	5.381.012	6.766.147	20,47
Europa	4.734.300	4.228.192	-11,97
América	3.855.299	3.832.937	-0,58
Oceanía	181.480	157.864	-14,96
Mundo	47.827.402	54.593.391	12,39

Producción total (t)			
Continentes	2001	2010	Incremento entre años (%)
Asia	583.730.215	790.733.563	26,18
Europa	92.542.032	93.805.115	1,35
América	75.706.434	79.962.438	5,32
África	49.231.285	68.295.437	27,91
Oceanía	3.653.375	3.519.061	-3,82
Mundo	804.863.341	1.036.315.615	22,33

Cuadro 2. Producción (ha) de las diez hortalizas más cultivadas, a nivel mundial. Año 2010 (fuente: FAOSTAT, 2012).

Cultivo	Producción total (t)
Tomates	151.699.405
Sandías	99.161.274
Pepinos y pepinillos	62.430.796
Berenjenas	43.891.773
Chiles, pimiento picante y verde	29.421.327
Otros melones (incluido canteloup)	26.396.537
Lechuga y achicoria	24.239.977
Calabazas, calabacines y calabaza confitada	22.905.868
Judías verdes	19.834.297
Fresas	4.356.834

El sector europeo de las hortalizas desempeña uno de los papeles principales en los mercados agrícolas del mundo, siendo el segundo continente a nivel de producción, después de Asia, y el tercero en número de hectáreas cultivadas, después de Asia y África (**cuadro 1**). En la UE-27, se cultivaron el 56,43% de las 4.228.192 ha totales de hortalizas cosechadas y se produjeron el 68,50% de las 93.805.115 t totales producidas en el continente durante la campaña 2009-2010. Las regiones del sur son las mayores productoras y exportadoras, con

Italia y España a la cabeza ya que, respectivamente, producen el 22,10% y el 19,74% del total de la producción de los 27 (**datos elaborados a partir del cuadro 1, incluido en el anexo**).

El cultivo de especies vegetales en condiciones protegidas, según referencia el historiador Columella, tiene su origen en Roma. El horticultor, con el uso de protecciones, intenta evitar aquellas variables que perjudican a sus cultivos y potenciar aquellas que los favorecen para cubrir todas sus necesidades, en cualquier estación del año, cuando la producción al aire libre se encuentra limitada. A lo largo de los siglos, la colocación de una pantalla o protección se ha llevado a cabo con diversos materiales y estructuras, hasta llegar a la construcción del invernadero de nuestros días. El nacimiento del invernadero data del siglo XIII, en Italia, debido al interés que mostraban los europeos por el cultivo de plantas exóticas. A los invernaderos de aquella época se les conoce con el nombre de “jardines botánicos”. Se trataba de unas estructuras de marcos de madera, paredes de piedra y un techo sólido. Gracias a la eliminación, en el siglo XIX, del impuesto sobre el vidrio, se potenció la utilización de este material en la construcción de los invernaderos, especialmente en el techo y las paredes. Además, los avances en la ingeniería del hierro permitieron incluirlo en las estructuras, aportando una mejora a su desarrollo gradual hasta el invernadero moderno (**figura 1**) (Lawless, 2001).



Figura 1. Palm House en Royal Botanical Gardens de Londres. Invernadero victoriano de hierro y cristal más importante del mundo, construido a mediados del s. XIX.

El desarrollo económico del siglo XX, sobre todo tras la Segunda Guerra Mundial, hizo que proliferara la construcción de invernaderos de cristal en los

países centroeuropeos. Sin embargo, la crisis energética de los años 70 y la introducción de las láminas de plástico fueron la mayor contribución para que se produjera una enorme expansión de la superficie de invernaderos en Oriente (Japón y China, principalmente) y en los países mediterráneos (con España e Italia a la cabeza de la superficie empleada para tal fin), donde se desarrollará “la agricultura bajo plástico” (**figura 2**) (Castilla, 2005).



Figura 2. Estructura de invernadero de plástico tipo parral, común en el sureste español.

En la actualidad, la superficie agrícola europea protegida bajo plástico no se encuentra distribuida de manera homogénea. Los países mediterráneos son los que presentan una mayor superficie invernada y es donde se concentra la producción; siendo el cultivo de hortalizas la opción más generalizada. En la Cuenca Mediterránea, el número de cultivos susceptibles de realizarse bajo invernadero es relativamente reducido. El tomate es el primero en importancia; seguido, a gran distancia, del pimiento, el melón, el calabacín y, con posterioridad, de la berenjena, el pepino y la sandía (FAO, 2002). España, con 66.363 ha, es el país con mayor superficie dedicada a cultivos protegidos, seguida de Italia (25.000 ha), Francia (9.500 ha), Grecia (3.710 ha) y Portugal, con una superficie semejante a Grecia. En estos países, la producción de hortalizas invernadas se concentra en las regiones del sur. Tal concentración geográfica viene dictada por la benignidad del clima que permite el cultivo de invierno bajo protección sin el uso de calefacción, salvo en algunas zonas para cultivos específicos. En cualquier caso, la superficie de Holanda (3.237 ha) también es relevante, sobre todo, por su localización estratégica y su alta tecnificación (FAO, 2002; Cantliffe y Vansickle, 2003).

En los últimos 20 años, la superficie española de cultivo protegido se ha incrementado, paulatinamente, respecto al resto de técnicas de cultivo, debido a que los agricultores han obtenido un mayor rendimiento productivo y unos elevados beneficios al exportar las hortalizas recolectadas en invierno como productos “fuera de estación” (Castilla, 1994; MAGRAMA, 2011). En el año 2010, las 57.625 ha españolas dedicadas a la horticultura protegida representaron un 19,5% del total de la superficie hortícola. Dichas hectáreas están repartidas, casi en su mayoría, a lo largo del área mediterránea, destacando las provincias de Almería (37.575 ha), Huelva (6.525 ha) y la comunidad autónoma de Murcia (4.733 ha) (**anexo: cuadros 2 y 3**). Por tanto, Andalucía es la principal productora de hortalizas bajo abrigo (**cuadro 3**).

Cuadro 3. Superficie hortícola bajo abrigo (ha), en las principales comunidades autónomas productoras españolas, durante la campaña 2010 (fuente: MAGRAMA, 2011).

Cultivo	Superficie protegida (ha)				
	Andalucía	Canarias	Extremadura	Murcia	Valencia
Tomate	11.511	1.544	2	2.764	639
Pimiento	7.915	90	13	1.222	518
Sandía	5.188	27	0	163	1.150
Calabacín	5.161	150	0	71	62
Pepino	4.621	234	20	150	61
Melón	4.133	70	1.994	228	276
Judía verde	2.403	81	0	6	27
Berenjena	1.976	29	0	6	45

En la provincia de Almería se concentra la mayor superficie dedicada a la producción hortícola intensiva bajo plástico de España. En los últimos 50 años, el desarrollo de su horticultura ha sido excepcional. Su superficie ha crecido de forma exponencial, pasando de 0,5 ha en el año 1963 a 28.414 ha en el año 2000. Dicha superficie, en su mayoría, se encuentra centralizada en tres comarcas: Poniente, también conocida como Campo de Dalías (**figura 3**), Bajo Almanzora y Cabo de Gata-Níjar.

En la campaña 2009-2010, la superficie de invernaderos almeriense fue de 26.500 ha (Molina y Marzo, 2010), con una producción media de 1,5 cosechas al año, teniendo en cuenta que, aproximadamente, el 40% de las hectáreas hicieron doble cultivo. En esta provincia, las principales especies hortícolas cultivadas bajo plástico son ocho: el tomate es el cultivo principal, con una superficie en torno a las 9.700 ha (campaña 2009-2010), seguido del pimiento, calabacín, sandía, pepino, melón, berenjena y judía verde (**cuadro 4**). Dichas hortalizas se suelen

producir en dos ciclos de cultivo, otoño-invierno y primavera-verano, en los que predomina el monocultivo o la alternancia de dos tipos de cultivo. En el caso de la alternancia, se suelen utilizar especies de ciclo largo en el periodo de otoño-invierno, generalmente, tomate, pimiento, berenjena, judía verde y pepino, y especies de ciclo corto, como el calabacín, sandía y melón, en el periodo de primavera-verano; aunque los cultivares de ciclo largo adaptados a dicho periodo de primavera-verano también son una alternativa (Céspedes *et al.*, 2009). Estas especies son seleccionadas por tener unas exigencias térmicas medias, entre 17° y 28 °C, que permiten alargar, fuera de la época convencional, su calendario de producción. Otros requerimientos climáticos mínimos son: 6 horas de insolación diarias durante los meses más cortos del año (en el hemisferio boreal, noviembre, diciembre y enero; en el austral, mayo, junio y julio), una temperatura del suelo superior a 14 °C y humedades relativas (HR) entre 70% y 90% (Castilla, 2005).



Figura 3. Extensión de invernaderos del poniente almeriense. Vista panorámica, año 2011.

En la actualidad, la agricultura intensiva almeriense goza de buena salud. Los datos correspondientes a la campaña 2011-2012 (Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 2012) mostraron un incremento del 13,1% en el valor comercial de la producción (2.336 millones de euros) con respecto a la campaña anterior. Las exportaciones presentaron la misma tendencia, incrementándose en un 11,6%, según datos del Instituto de Comercio Exterior (ICEX). Se puede considerar, por tanto, a Almería como la primera provincia exportadora del conjunto del estado español.

Cuadro 4. Superficie bajo abrigo (ha) y rendimientos (kg / ha) de los principales cultivos hortícolas almerienses. Año 2010 (fuente: MAGRAMA, 2011).

Cultivo	Superficie protegida (ha)	Rendimiento (kg / ha)
Tomate	9.794	87.093
Pimiento	7.398	58.876
Calabacín	4.830	53.894
Sandía	4.641	61.030
Pepino	4.498	84.108
Melón	3.756	35.868
Berenjena	1.823	76.609
Judía verde	740	14.088

Estos datos justifican que Almería sea considerada el “centro neurálgico” de la producción hortícola española y europea, así como un referente para el sector hortícola mundial. Esta consideración no sólo radica en sus cifras de producción y comercialización sino, también, en su capacidad de inducir actividad económica y de actuar como motor de toda su industria auxiliar (Céspedes *et al.*, 2009; Cabrera y Uclés, 2011). Su manera de cultivar bajo abrigo, extendida al resto de las provincias del sureste español, denominada “Agrosistema de invernaderos mediterráneos”, se caracteriza por unos requerimientos bajos (inputs) de tecnología y energía, porque se desarrolla en zonas con inviernos relativamente suaves que permiten, a diferencia del resto de Europa, una reducción considerable en el coste del control climático (Castilla y Hernández, 2005). La cercanía de los mercados europeos y las bondades del clima siempre han favorecido la fortaleza del sector. Sin embargo, en los últimos diez años, la competencia con nuevas zonas productoras en los mercados internacionales, la concentración de la demanda, el cambio climático y la crisis económica han supuesto un gran reto para seguir garantizando la rentabilidad de los agricultores de la zona. No obstante, cabe señalar que el sector agrícola almeriense ha demostrado que, en situaciones de crisis, está ya muy lejos de comportarse como el sector primario agrícola que fue tiempo atrás, y es capaz de asumir nuevos retos tecnológicos. Un claro ejemplo es la situación de alarma sufrida en el año 2007, cuando un laboratorio alemán detectó varias partidas de pimiento, exportadas desde Almería, que superaban el Límite Máximo de Residuos (LMR) permitido. Ante esta circunstancia, se llevó a cabo una reducción drástica del uso de fitosanitarios y una implantación progresiva del Control Integrado de Plagas. A esta situación, en el sector internacional, se la denominó “la revolución verde

almeriense” (Beltrán *et al.*, 2010) y mostró a esta agroindustria como un sector dinámico, moderno y con un tejido empresarial (empresas dedicadas a la producción de plástico, fauna auxiliar, fitosanitarios, semillas, plantas...) vinculado por completo al modo de cultivar del sureste español.

El dinamismo de la horticultura almeriense ha hecho que las empresas, multinacionales o no, siempre tengan en cuenta al campo almeriense a la hora de realizar cualquier desarrollo nuevo para, con posterioridad, implantarlo en el mercado. Un claro ejemplo son las empresas de semillas o las empresas productoras de fauna auxiliar, que tienen a Almería como centro de experimentación y búsqueda de soluciones biológicas para las plagas y enfermedades. Dicho dinamismo queda, de igual manera, plasmado en los progresivos incrementos de los rendimientos de todos los cultivos, en general. Estas mejoras en los rendimientos se deben a los avances realizados en los sistemas de cultivo bajo abrigo (estructuras, control climático, sustrato de cultivo, fertilización,...), en los cultivares usados, en el control fitosanitario y en la polinización. Sin embargo, existen varios aspectos que explican el por qué el desarrollo no se produce de forma equitativa en todos los cultivos. Por una parte, influyen las condiciones climáticas de cada campaña; éste es un problema que comparten todos los cultivos bajo abrigo de la zona mediterránea. Por otra parte, influye el poco interés del mercado por el agricultor y su cultivo que se traduce en una falta de previsión de la demanda o de los precios; la falta de conocimiento de determinados procesos fisiológicos; la mano de obra poco especializada; la inadecuación de determinados cultivares a la zona de cultivo y la sensibilidad de éstos a enfermedades. En este sentido, en el caso del tomate y del pimiento, las fluctuaciones en los rendimientos son escasas, ya que ambos cultivos están bastante estudiados, y las variaciones suelen deberse a las enfermedades, en el caso del tomate, y a algunas limitaciones en los procesos fisiológicos durante el invierno y la primavera, en el caso del pimiento (Rylski, 1985; Rylski y Spigelman, 1986a, 1986b; Polowick y Sawhney, 1985; de Ruijter *et al.*, 1991; Aloni *et al.*, 1995 y 1999). En el pepino, además de los factores climáticos, suelen afectar la salinización progresiva del agua y el suelo, así como la variabilidad del mercado internacional. La judía verde es muy sensible a la salinidad y necesita mano de obra especializada. Otros cultivos, como el calabacín y la sandía, tienen como principales obstáculos la falta de conocimientos sobre las posibilidades de

mejorar los rendimientos en el cultivo protegido (la polinización, insuficiencias del material vegetal, manejo y enfermedades,...) (FAO, 2002; Castilla, 2005; Céspedes *et al.*, 2009).

A día de hoy, a pesar de la problemática descrita para cada cultivo, la situación del sector hortícola del sureste español sigue teniendo potencial, debido a que el consumo de hortalizas frescas se ha incrementado. Sin embargo, esta demanda va asociada a altas exigencias de calidad, seguridad alimentaria y trazabilidad, que van a ser claves para mantener la competitividad en los globalizados mercados europeos (Castilla, 2005). Entre dichas exigencias, los consumidores muestran su descontento con respecto a las propiedades organolépticas de las hortalizas frescas, así como con los métodos de cultivo que atentan contra el medio ambiente y la sociedad. Ante esta situación, el gobierno nacional empezó a tomar en consideración estas circunstancias aprobando, en Consejo de Ministros del 23 de noviembre de 2007, la “Estrategia Española de Desarrollo Sostenible” que contempla el código de buenas prácticas agrarias para incentivar la mejora de la gestión de los recursos agrarios y sus procesos, con el fin de incrementar la superficie de sumideros agrícolas que luchen contra el Cambio Climático. Por otra parte, la Junta de Andalucía ha implantado un sistema de Producción Integrada que sigue las directrices de la Organización Internacional de Lucha Biológica e Integrada (OILB), en cuanto a técnicas culturales y de manejo integrado de plagas para cultivos hortícolas en invernadero, que se revisa y mejora cada anualidad (Aparicio *et al.*, 2003; Castilla, 2005). Dentro de ambas iniciativas, hay que decir que la mejora de la polinización de los cultivos y el uso de organismos de control biológico, incluyendo a los polinizadores, como alternativa son una práctica que, cada vez, está ganando más adeptos.

2. LA POLINIZACIÓN EN LOS CULTIVOS PROTEGIDOS

La polinización es el proceso de transferencia del polen, desde las estructuras reproductivas masculinas hasta los estigmas receptivos de la flor, siendo el primer paso interactivo en el proceso reproductivo. La polinización se da en las plantas que tienen reproducción sexual, siendo un proceso previo y no equivalente a la fertilización, durante la cual se produce la fusión del material genético del polen y del óvulo (Kirk, 2005). A excepción de las especies autógamas que realizan de forma autónoma el proceso de polinización y las

especies partenocárpicas (algunos cítricos, las plataneras, higueras y otras), que producen frutos sin semillas con independencia de la polinización, el resto de especies requieren de la intervención de un vector, también denominado polinizador, para llevar a cabo la transferencia efectiva del polen y, como resultado, una producción óptima de frutos, tanto en cantidad como en calidad (Traveset, 1999).

Los vectores de polinización pueden ser abióticos, por ejemplo, el viento en plantas anemófilas, o bióticos, cuando la polinización es mediada por animales (zoofilia): pájaros, reptiles, mamíferos y, mayoritariamente, insectos (entomofilia) (Traveset, 1999; Klein *et al.*, 2007; Gallai *et al.*, cit. por Rundlöf y Smith, 2011). Desde el punto de vista de la producción de cultivos, el 75% de las especies cultivadas para alimentación se benefician en distinto grado de la polinización animal, jugando un papel muy importante la polinización entomófila, tanto al aire libre como en invernadero (Klein *et al.*, 2007; Gallai *et al.*, cit. por Rundlöf y Smith, 2011). De las 25.000 especies de abejas que se conocen en el mundo, la abeja melífera (*Apis mellífera*, L.) se considera el principal insecto polinizador de la mayoría de las especies cultivadas y el más empleado, de manera comercial, para todo cultivo que requiera polinización entomófila (Goulson, 2003; Mairson, cit. por Kirk, 2005; Klein *et al.*, 2007). Tanto es así que el valor añadido a la producción agrícola estadounidense, gracias a la polinización de las abejas melíferas, se estimó en más de 9.300 millones de US\$ a finales de la década de los 80 (Robinson *et al.*, 1989a, 1989b) y en 14.600 millones de US\$ a principios del siglo XXI (Morse y Calderone, 2000). Las abejas melíferas suelen considerarse polinizadores eficientes ya que son muy activas en la búsqueda de alimento para suplir sus necesidades y las de su prole (Bosh, 2005). No obstante, hay que tener en cuenta que abejorros, abejas solitarias y otros insectos (por ejemplo, moscas, mariposas, polillas, avispas y/o escarabajos) también realizan dicha tarea (**figura 4**) (Bosh, 2005; FAO, 2008; Rundlöf y Smith, 2011).

En general, las relaciones planta-polinizador datan del periodo Cretácico, cuando los insectos empezaron a adquirir comida de las flores y éstas mejoraron su éxito reproductivo, debido al mayor movimiento de polen por parte de los insectos (Tepedino, cit. por Kearns e Inouye, 1997). Desde entonces, no hay duda que la expansión masiva de las angiospermas y la evolución de sus sistemas reproductivos han estado influenciadas por la polinización biótica y por la

atracción que ejercen las flores sobre los polinizadores (Traveset, 1999). Así, la polinización mediante animales se caracteriza por la producción de atractivos (tamaño y forma de la flor, color, aromas) y recompensas (por ejemplo, polen, néctar o protección) por parte de las flores. La antesis de éstas se sincroniza, generalmente, con la producción de las recompensas y, en consecuencia, con la actividad del polinizador. El polen es pegajoso y se adhiere con facilidad al cuerpo de los vectores. Una vez recogido, tiene una elevada probabilidad de alcanzar un estigma receptivo, por lo cual la ratio polen / óvulo suele ser menor que en las plantas cuyos agentes de polinización son abióticos (Sedgley y Griffin, 1989).



Figura 4. Ejemplos de polinización entomófila, de la esquina superior izquierda a la inferior derecha: abeja melífera polinizando una flor asterácea (fuente: www.blogspot.com); abejorro en una flor de tomate (autor: Pepe Ferrer); abejorro en inflorescencia de *Callistemon citrinus* (autor: J.M. Guerra); mariposa monarca en una flor de girasol (autora: Lisa Ann Britz).

En ecología evolutiva, se conoce como “síndrome de polinización” a la combinación de los rasgos estructurales, atractivos y recompensas de la planta, que permite intuir cómo se traslada el polen. Desde Darwin (1862), muchos autores han estudiado las diversas combinaciones de dichos rasgos florales con los polinizadores para entender la evolución de ambos reinos. Cada síndrome de polinización recibe un nombre, en función de los principales polinizadores que visitan la planta. Así, se dice que las plantas polinizadas con abejas presentan un síndrome de melitofilia, caracterizado por: flores con colores que varían entre

azul, blanco, amarillo y rosado; antesis diurna; muy fragantes; con simetría actinomorfa o zigomorfa; forma tubular poco o muy profunda; el néctar escondido y cantidad de polen que varía según la especie. Este concepto es una buena herramienta para entender los mecanismos de diversificación floral (Fenster *et al.*, 2004). El alto grado de especialización que llegan a alcanzar algunas flores para conseguir una polinización efectiva se debe a una estrecha relación con su vector de polinización. Sin embargo, otros autores han observado que los sistemas de polinización son más dinámicos y generalistas de lo que cabría esperar (Traveset, 1999; Herrera, 2009). En cualquier caso, la adaptación de la planta a los animales polinizadores es un factor importante pues contribuye al éxito reproductivo mediante la atracción de los polinizadores y limitando los cruces con otras especies (Galliot *et al.*, 2006). De esta manera, el polinizador ha de recibir una recompensa suficiente de su visita a las flores para convertirse en parte habitual de la actividad vital de éstas (FAO, 2008; Herrera, 2009). En este sentido, no cabe duda de que para que la naturaleza siga ofreciendo la polinización como un “servicio gratuito”, ésta necesita del mantenimiento de refugios de vegetación natural para los polinizadores. Cuando estos recursos se reducen o se pierden debido a la fragmentación del hábitat, al empleo de sustancias químicas agrícolas e industriales, la presencia de parásitos y enfermedades o por la introducción de especies exóticas, se limita la actividad de los polinizadores, por lo que se necesitan prácticas de gestión adecuadas para restablecer sus medios de subsistencia (Ashman *et al.*, 2004; http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=11761&page=131, 2007; FAO, 2008; Klein *et al.*, 2007).

Para las plantas, la producción de frutos es un proceso natural que facilita la dispersión de semillas para generar nuevos individuos (Sedgley, 1990). El sistema reproductivo más extendido en la mayoría de las plantas es la polinización cruzada o alogamia, pues promueve la heterocigosis y la variabilidad genética que supone, a largo plazo, mayor probabilidad de supervivencia y adaptación de las especies (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993). La reducción de la endogamia se suele considerar como la mayor fuerza motriz que ha modelado el diseño floral y la evolución de los sistemas de polinización. Las plantas, para promover la polinización cruzada, han desarrollado distintos tipos de relaciones estructurales y funcionales entre los órganos reproductivos femeninos y masculinos de las flores, que se engloban en tres mecanismos:

-La hercogamia o separación espacial de los sexos a nivel de flor en distintos estratos. Si la separación se produce en flores distintas dentro del mismo individuo, se define como monoecia y, si la separación se produce entre individuos distintos, se trata de dioecia (Webb y Lloyd, 1986).

-La separación temporal de los sexos, o dicogamia, se conoce como protoginia, en el caso de que maduren en primer lugar los órganos femeninos de la flor, o como protandria, si maduran antes los órganos masculinos (Lloyd y Webb, 1986; Bertin y Newman, 1993; Barrett, 2002).

-La autoincompatibilidad polen-pistilo es el sistema más extendido en las angiospermas (Barrett, 1988) y se define como la incapacidad parcial o total en plantas hermafroditas o monoicas de producir semillas viables bajo condiciones de autopolinización (Heslop-Harrison, 1975).

Tanto dicogamia como hercogamia, son mecanismos favorecedores de la polinización cruzada previos a la deposición de polen, mientras que la autoincompatibilidad polen-pistilo es un mecanismo post-polinización.

Toda polinización es, por tanto, una “empresa compartida” entre el vector de polinización y la planta y, para que sea eficaz en un cultivo, requiere un conocimiento exhaustivo de todos los factores que interactúan en este sistema (Sedgley y Gridffin, 1989; Traveset, 1999). La polinización eficiente tiene un efecto positivo directo en el rendimiento y en la calidad de los cultivos, siempre y cuando no se olvide el importante papel que juegan las condiciones climatológicas, la nutrición mineral, el riego, la fisiología y la variedad de la planta, para que la fecundación y la maduración del fruto sean óptimas. Cuando se cultiva, las plantas suelen desvincularse del ecosistema donde crecieron por lo que, en numerosas ocasiones, se producen déficits de polinización que dan lugar a una disminución del rendimiento productivo y de la calidad del fruto. Para detectarlos e intentar solventarlos es necesario conocer:

a) Los mecanismos reproductivos de las especies cultivadas; es decir, si dicha especie necesita polinización cruzada, el momento de la dehiscencia del polen y la receptividad estigmática en relación con la actividad diurna y estacional de los vectores.

b) La dinámica de dispersión del polen en especies anemófilas.

c) La dinámica de poblaciones y el comportamiento de los vectores de polinización, en el caso de especies entomófilas.

d) La influencia de las condiciones climáticas en la sincronización de los eventos dentro de la flor, en la dispersión del polen y en la actividad de los vectores.

e) El comportamiento de los posibles polinizadores, así como la cantidad necesaria y su interacción con el cultivo, para determinar su efectividad ya que, por un lado, un número escaso de visitas a la flor puede dar como resultado un número bajo de óvulos fecundados y, en consecuencia, frutos con bajo estándar de calidad; y, por otro, una polinización excesiva puede causar daños a los órganos reproductores de la flor con la consecuente pérdida prematura de la propia flor y del futuro fruto. En este sentido, en las especies entomófilas, el polinizador debe cumplir una serie de características deseables (Smith, cit. por Sedgley y Griffin, 1989): visitar con asiduidad las flores en ambas fases sexuales, en el momento de la dehiscencia de polen y de la receptividad estigmática; ser capaz de trabajar en un amplio rango de condiciones climáticas, que se puedan dar durante el periodo de floración; visitar muchas plantas de la misma especie, es decir, que presente constancia floral; transportar cargas significativas de polen viable; contactar con los estigmas, asiduamente, y que su número sea el suficiente para que todo el polen generado, a lo largo de la vida productiva de la planta, sea transferido.

La producción de frutas y hortalizas depende en gran medida de una adecuada polinización ya que si es insuficiente deriva en una baja productividad en muchos cultivos (Shivanna y Sawney, 1997; Pinillos y Cuevas, 2008). Sin embargo, todavía se desconoce el grado de dependencia real de los polinizadores en muchos cultivos importantes. A pesar de ello, si se sabe que algunos cultivos dependen totalmente de la polinización animal para dar fruto (por ejemplo, calabaza, calabacín, sandía, melón, kiwi, nuez de macadamia) mientras que otros son capaces de generar el 90% de semillas o el máximo rendimiento de fruto sin ellos (por ejemplo, olivo, pimiento, quínoa, uva) (Klein *et al.*, 2007).

La horticultura bajo plástico, al igual que el resto de los sistemas agrícolas, requiere de una polinización eficiente en sus cultivos. Sin embargo, la existencia de barreras físicas, que impiden el acceso de los vectores a las flores, no permite que se produzca una polinización natural satisfactoria. Esto da lugar a déficits de polinización, cuya gravedad está relacionada con las barreras reproductivas que presenta cada especie para favorecer la alogamia, así como con el efecto de las condiciones ambientales extremas, propias de un invernadero, sobre los órganos

reproductivos de las plantas. Respecto a las barreras reproductivas, en el caso de las especies hortícolas producidas en Almería, a excepción de la judía verde y del pimiento, que tienen un alto nivel de autopolinización, y del pepino, que la mayoría del producido en esta provincia es partenocárpico, el resto tiene un alto factor de dependencia de los vectores de polinización (**cuadro 5**) debido a las características de su biología floral (**cuadro 6**). En relación a las condiciones ambientales, las temperaturas extremas afectarán al desarrollo de la flor y, como consecuencia, a los procesos productivos (Iwahori, 1965; Aloni *et al.*, 1991, 1994, 1995 y 1999; Rylsky y Aloni, 1991; Pressman *et al.*, 1998a, 1998b y 2002), mientras que las condiciones de humedad extrema afectarán al polen, entre otras estructuras de la flor, compactándolo o desecándolo en exceso y repercutiendo negativamente en su transporte al gineceo de la flor.

Cuadro 5. Producción (t), valor de la producción (miles de €), factor de dependencia de la polinización (rango que varía de 0, menor dependencia, a 1, mayor dependencia) y valor económico generado por la actividad de los polinizadores (miles de €) en las principales hortalizas de la provincia de Almería. Año 2002 (fuente: Guerra-Sanz *et al.*, 2005).

Especie	Producción (t)	Valor de la producción (Miles de €)	Factor	Valor generado por polinizadores (Miles de €)
Sandía	200.210	54.057	0,4	21.622,8
Melón	163.024	84.772	0,6	50.863,2
Calabacín	229.352	144.492	0,6	86.695,2
Pepino	262.200	167.808	0,1	16.780,8
Berenjena	70.200	35.100	0,6	21.060
Tomate	806.736	572.783	0,6	343.669,8
Pimiento	542.925	352.901	0,2	70.580,2
Judía Verde	64.970	70.817	0,01	708,17
TOTAL	2.339.617	1.482.730		611.980,17

La polinización asistida, también llamada “artificial” o “suplementaria” en los manuales agrícolas, es la alternativa a las limitaciones que supone el cultivo bajo plástico. Ésta se define como la aplicación de polen suplementario compatible, previamente recolectado por medios biológicos o mecánicos. Dicha aplicación artificial se considera como una herramienta muy útil que, en la mayoría de los casos, conduce a un aumento de la producción y a una mejora de la calidad del fruto (González *et al.*, 1998; Solé *et al.*, 2000; Cuevas y Pinillos, 2005). Desde hace varios años, el uso de insectos como polinizadores en cultivos de invernadero se considera una buena práctica que ha desplazado a técnicas

mecánicas más tediosas y menos eficientes, como la aplicación manual, por viento o por vibración (Roldán-Serrano y Guerra-Sanz, 2004). Los estudios realizados con las abejas de miel (de Ruijter *et al.*, 1991; Kubisová y Haslbachová, 1991; Dag y Kammer, 2001; Cruz *et al.*, 2005), abejorros de dos especies, *B. terrestris* y *B. impatiens* (Abak *et al.*, 1995 y 1997; Shipp *et al.*, 1994; Meisels y Chiasson, 1997; Dag y Kammer, 2001), abejas solitarias, *Osmia cornifrons* (Kristjansson y Rasmussen, 1991), *O. cornuta* (Monzón *et al.*, 2004) y *Megachile rotundata* (Pitts-Singer y Bosch, 2010), o el sírfido *Eristalis tenax* (Jarlan *et al.*, 1997a, b, c), tanto en ensayos comerciales como de investigación, han dejado claro que la actividad de cualquier polinizador siempre mejora la calidad y/o la cantidad de frutos en comparación con los obtenidos en los cultivos controles (con autopolinización). Esto ha llevado a comercializar algunos de ellos para su utilización en cultivos protegidos.

Cuadro 6. Biología floral: tipo de flor, producción de néctar, tipo de dehiscencia de anteras y rasgos especiales de las principales hortalizas cultivadas en invernaderos de Almería (fuente: Guerra-Sanz *et al.*, 2005).

Especie	Tipo de flor	Néctar	Dehiscencia de antera	Rasgos especiales
Tomate	Hermafrodita (solitaria o en racimo)	Ausente	Poricida	Necesidad vibración anteras
Pimiento	Hermafrodita	Presente	Longitudinal	Néctar varía según cultivar y época del cultivo
Berenjena	Andromonoica	Ausente	Poricida	Necesidad vibración anteras
Melón	Andromonoica o Monoica	Presente	Longitudinal	Alto nº visitas en flor para fruto de calidad
Sandía	Monoica	Presente	Longitudinal	Alto nº visitas en flor para fruto de calidad
Calabacín	Monoica	Presente	Longitudinal	Antesis floral breve (6 h)
Pepino	Monoica	Presente	Longitudinal	Cultivares con partenocarpia
Judía Verde	Hermafrodita	Presente	Longitudinal	Presentación secundaria del polen

A nivel mundial, el uso comercial de abejas melíferas, solitarias y/o abejorros ha sido una práctica generalizada en algunos cultivos hortícolas protegidos. En este sentido, el cultivo de tomate es paradigmático ya que es el primer cultivo hortícola en el que la polinización realizada con abejorros (*Bombus terrestris*, L.) ha desplazado por completo a la polinización manual, creando al mismo tiempo una actividad comercial de muchos millones de euros (Morandin *et al.*, 2001; Velthuis y van Doorn, 2006; Rundlöf y Smith, 2011). En el caso de España, la introducción de insectos polinizadores en las especies hortícolas

cultivadas bajo abrigo se inició, para dicho cultivo, en la provincia de Almería. Las primeras experiencias se realizaron al inicio de los años 90 (Navarro-Castillo, 2002) y, tras una cierta reticencia del sector, su implantación llegó al 99,5% del total de hectáreas de tomate cultivadas en el año 2005. Sin embargo, en el resto de los cultivos, a pesar de la probada necesidad de un polinizador, en mayor o menor grado (**cuadro 5 y 6**), tan sólo en la sandía y el melón se generalizó la utilización de abejas melíferas como método asistido de producción de fruto en el 100% y el 95,6% de los casos estudiados. En la misma campaña, en pimiento sólo se utilizó el abejorro en un 5,9%. Para el resto de cultivos, a pesar de no obtener la máxima producción y calidad, el sector continuó conformándose con los resultados obtenidos u optaron por la inducción de fruto mediante la aplicación de fitohormonas. Dicha aplicación se realizó de modo sistemático, en un 66% de las explotaciones de calabacín muestreadas, o de modo puntual, en todos los cultivos, cuando las condiciones no fueron propicias para alcanzar una fecundación exitosa (Céspedes *et al.*, 2009).

El hecho de que, en el marco de la superficie invernada española, el uso de insectos polinizadores no esté generalizado se debe a que, por un lado, existe un desconocimiento general de la biología reproductiva de las especies hortícolas o, al menos, el conocimiento es menos profundo que en los cultivos frutales y, por otro, se ha prestado más atención a otros aspectos del cultivo (fertilización, riego, plagas,...) (Castilla, 2005). El estudio de la polinización se ha dejado de lado debido a la complejidad de los procesos biológicos involucrados que, como ya se dijo con anterioridad, son el conocimiento de la biología floral, de los atractivos y recompensas florales, del comportamiento y manejo de insectos vectores, de los efectos derivados de los tratamientos contra plagas, etc. Además, los polinizadores, tanto en el caso de los que provienen de forma espontánea del exterior, como los introducidos por el hombre, deben adaptarse a las condiciones atípicas del invernadero que afectan a su actividad: la profunda alteración del clima, los tratamientos químicos para el control de plagas y enfermedades, así como las coberturas plásticas con aditivos que reducen la luz y les dificultan la visión (Kevan, 1999; Klein *et al.*, 2007; Rundlöf y Smith, 2011). Tampoco hay que olvidar los posibles problemas patológicos que puedan sufrir los polinizadores empleados, como es el caso de las infestaciones de ácaros y otros patógenos en colmenas de abejas melíferas y abejorros (Calderone y Spivak, cit. por Shupp *et*

al., 1997; Graystock *et al.*, 2013).

Para el manejo de los insectos polinizadores, es fundamental no olvidar que para encontrar las flores y tomar sus decisiones, responden a estímulos visuales, olfativos, gustativos y de tiempo (Waddington, cit. por Cabello *et al.*, 2006) y que dicha respuesta se ve modulada por su capacidad de aprendizaje (Weiss, 2001); en especial, en el caso de los himenópteros (Chittka y Menzel, 1992). Los estímulos gustativos de las plantas son los que, en principio, despiertan un mayor interés en investigación, porque están directamente relacionados con la búsqueda del alimento por parte del polinizador; sin embargo, la forma, el color y el olor floral también contribuyen en la atracción de los insectos polinizadores y, de manera especial, en abejas y abejorros (Waser, cit. por Cabello *et al.*, 2006). La morfología floral influye en la eficiencia de la recolección y deposición del polen por parte de los polinizadores cuando visitan la flor (Syafaruddin *et al.*, 2006). El color de las flores juega un papel fundamental como estímulo ya que posibilita su detección a distancia (Chittka y Thomson, cit. por Cabello *et al.*, 2006). Por otro lado, los aromas florales son metabolitos secundarios de la plantas, por tanto, no son esenciales para su crecimiento y desarrollo (Schoonhoven, cit. por Dötterl, 2006). No obstante, las plantas los producen con el fin de estimular las visitas de sus polinizadores a distancia, compartiendo el mismo papel que el color (Henning *et al.*, 1990; Loughring *et al.*, 1991; Masson *et al.*, 1993; Matile y Altenburger, 1988; Pham-Delegue *et al.*, 1989 y 1990). Los aromas florales ayudan al polinizador, con independencia del orden al que pertenezca, a orientarse, a acercarse a la flor, al reclutamiento, al aterrizaje, a la extensión de la trompa, al sondeo y al aprendizaje asociativo e incluso a la repelencia, con independencia de que el olor sea más penetrante o imperceptible por el olfato humano. La relevancia del olor es mayor para los polinizadores más especializados (caso de colibríes, mariposas de cola de golondrina y escarabajos mono) mientras que, sólo o en combinación con otras señales, es utilizado por la mayoría de abejas, moscas, escarabajos, polillas, murciélagos y mariposas (Raguso, 2005).

Las dificultades expuestas han hecho que, en nuestro país, existan escasos trabajos científicos sobre los estímulos presentes en hortalizas, comparando con otros grupos vegetales, como adaptación filogenética a la alogamia mediante polinización entomófila, y su relevancia para conseguir una buena polinización en cultivos protegidos. Sin embargo, el hecho de que existan trabajos internacionales

de referencia, como los de Dobson (2005) o Morse *et al.* (2012) en tomate, y que las exigencias del mercado y de los consumidores, sobre todo desde el año 2007, sean cada vez mayores, hace necesario estudiar estos aspectos de una forma integral, buscando vectores robustos y activos capaces de sobreponerse a las exigentes condiciones de un invernadero, con el fin de mejorar la producción de las cosechas mediante métodos naturales (Castilla, 2005; Guerra-Sanz *et al.*, 2005).

3. EL ABEJORRO COMO VECTOR DE POLINIZACIÓN ASISTIDA

Los abejorros son insectos pertenecientes al orden *Himenoptera*, con más de 100.000 especies descritas (Richards y Davies, 1984), superfamilia *Apoidea* y familia *Apidae*, a la que vulgarmente se le conoce con el nombre de “abejas”. Estos insectos están englobados dentro de la subfamilia *Bombinae* que, según el catálogo publicado por Dalla Torre en 1896, a su vez estaba compuesta por 228 especies pertenecientes al género *Bombus* (Latreille, 1802), consideradas como los “verdaderos” abejorros, y por 27 especies del género *Psithyrus* (Lepeletier, 1832), conocidas como “cucos”, inquilinos que viven dentro de los nidos de los verdaderos abejorros y se alimentan de la comida que recolectan sus huéspedes (Ornosa, 1986a; Williams, 1998). Su taxonomía es notoriamente difícil porque, como grupo, son monótonos en cuanto a su morfología. Así, en el género *Bombus* se han intentado muchas subdivisiones, la mayoría abandonadas. Las clasificaciones tempranas dependieron, en gran medida, de los patrones de color, criterio que hoy resulta insuficiente porque la mayoría de las especies exhiben una considerable variación de color, tanto dentro, como entre poblaciones. Otra clasificación realizada por Krüger (1920) dividió dicho género en dos secciones, *Odontobombus* y *Anodontobombus*, basándose en la presencia o ausencia de una espina en el tarso basal medio de las hembras. Esta clasificación es útil ya que parece corresponder con diferencias de comportamiento entre castas. La especie con la que se trabaja en esta tesis doctoral, *Bombus terrestris* (L.), pertenece al grupo de los *Anodontobombus*, que se caracteriza por la peculiar cría de sus larvas mediante el almacenamiento de polen (Goulson, 2003). Finalmente, las clasificaciones basadas en la genitalia del macho (**figura 5**) han sido las más útiles permitiendo que, en la actualidad, se considere un único género de abejorros,

Bombus, y varios subgéneros, entre los que se encuentra *Psithyrus* (Williams, 1998).



Figura 5. Detalle de la parte dorsal de la genitalia de los machos. El diagrama muestra la terminología de las distintas partes para el caso del abejorro *B. avinoviellus* (fuente: <http://www.nhm.ac.uk/researchcuration/projects/bombus/genitalia.html>, Copyright 2007).

La mayoría de los abejorros se hayan distribuidos en el hemisferio boreal, en latitudes comprendidas entre los 60° y 65°; con 170 especies en Europa y Asia (incluidas Filipinas, Sumatra, Java, Formosa y Japón) y 50 especies en América del Norte (Pouvreau, 1984). Se han encontrado en África, al norte del Sáhara (Heinrich, 1979), a 880 km del Polo Norte y en Tierra de Fuego, mientras que en la fauna de Australia y de Nueva Guinea no han sido descritos. En altitud, se han llegado a ver a más de 3.600 m, en la cordillera del Himalaya, en las Montañas Rocosas, así como en la cordillera de los Andes (**figura 6**). La especie *Bombus terrestris* se encuentra distribuida, de forma natural, en la región Paleártica (centro y sur de Europa, norte de África, Madeira, Islas Canarias y este de Afganistán) y fue introducida a finales del siglo XIX en Nueva Zelanda (Gurr, 1957; Macfarlane y Gurr, 1995), Tasmania (Cardale, 1993; Stout y Goulson, 2000), Brasil (Thorp, 2003), Chile (Torretta *et al.*, 2006), México (Winter *et al.*, 2006) y Japón (Washitani, cit. por Thorp, 2003; Inoue *et al.*, 2008). En Australia, excluyendo sus islas (Nueva Gales del Sur), se cree que fue introducida sin permiso (Froggatt, cit. por Franklin, 1913). Recientemente, se ha descrito la expansión de la especie a Argentina (Torretta *et al.*, 2006). Dentro de la especie *B. terrestris* se engloban las siguientes subespecies (subsp.): *B. terrestris* subsp. *terrestris* (Linnaeus, 1758: 578), *B. terrestris* subsp. *canariensis* (Pérez, 1895: 191), distribuida en Canarias, y *B. terrestris* subsp. *maderensis* (Erlandsson, 1979: 191), autóctono de la Isla de Madeira aunque, en la actualidad, hay controversia entre los investigadores ante esta consideración (Estoup *et al.*, 1996; Chittka *et al.*, 2004). Otras subespecies

son *B. terrestris* subsp. *ferrugineus* (Schmiedeknecht, 1878) que se encuentra en la Península Ibérica y Baleares (Sladen, 1912; Ceballos, 1956; Ornos, 1986a, 1986b, 1991), *B. terrestris* subsp. *dalmatinus* (Dalla Torre, 1882) presente en el norte de Italia, los Balcanes, Grecia y Turquía, *B. terrestris* subsp. *sassaricus* (Tournier, 1890: 223) autóctono de la Isla de Cerdeña y visto al sur de Francia, *B. terrestris* subsp. *xanthophus* (Kriechbaumer, 1870: 157), *B. terrestris* subsp. *audax* (Harris, 1776: 130 [*Apis*]), nativa del Reino Unido, y las subsp. *terrestriformis* (Vogt, 1911: 56), *lusitanicus* (Krüger, 1956: 78) y *africanus* (Vogt, cit. por Krüger, 1956: 91) que, en la actualidad, se encuentran en examen (<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/bombus/bo.html>, Copyright 2013).

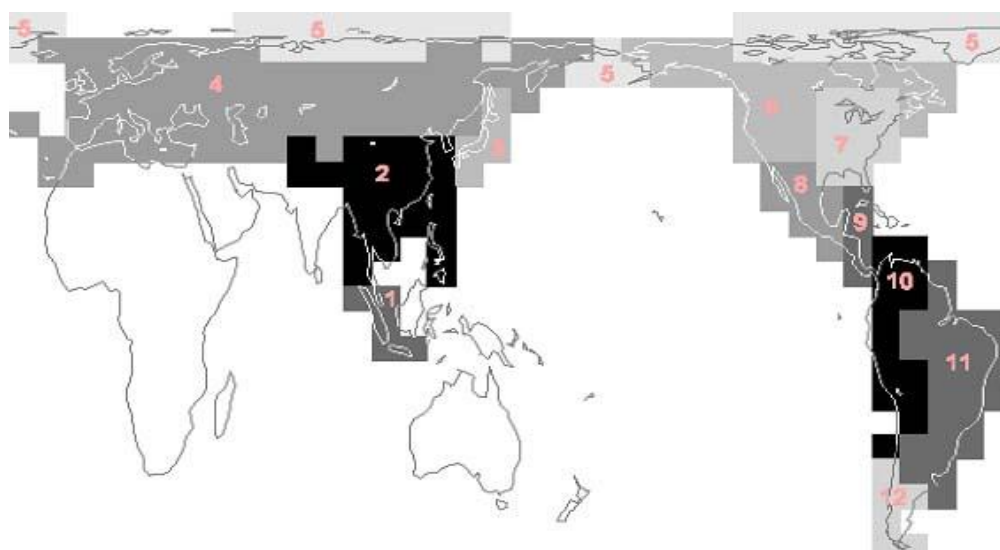


Figura 6. Regiones biogeográficas del mundo para los abejorros (actualizado por Williams, 1996). 1 Sumatra, 2 Oriental, 3 Japón, 4 Paleártica, 5 Ártica, 6 Neártica Oeste, 7 Neártica Este, 8 Neártica Sur, 9 Norte Neotropical, 10 Oeste Neotropical, 11 Este Neotropical, 12 Sur Neotropical (fuente: www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/bombus/introduction.html, Copyright 2007).

Gracias a los innumerables estudios realizados en la abeja melífera, debido a su importancia como insecto doméstico, se conoce parte de la biología de los abejorros. Como características comunes y propias de la familia a la que pertenecen ambas, figuran: una lengua larga, con algunos segmentos del palpo labial a modo de vaina; un labro más ancho que largo; una tibia posterior con largos pelos; una corbícula (excepto en los machos y algunas reinas) sin espolones, a excepción de los *Bombidae* y un clípeo protuberante. Los adultos presentan dos pares de alas membranosas, con las posteriores más pequeñas que el par anterior, y engranadas con las últimas mediante ganchos. Las alas anteriores,

por lo general, tienen tres celdas submarginales. Las piezas bucales adaptadas, en un principio, para morder, les sirven, a su vez, para lamer y chupar. El primer segmento del abdomen está fusionado con el metatórax y el ovipositor está modificado para serrar, picar o taladrar (**figura 7**) (Richards y Davies, 1984; Benton, 2006). La alimentación está basada en la recolección de polen, fundamental para el desarrollo de las larvas (Richards y Davies, 1984; Pouvreau, 1984), y néctar, fuente energética sin la cual no pueden volar (Goulson, 2003). Los sentidos del olor, sabor y tacto están localizados en las antenas. La visión, compartida entre dos ojos compuestos y tres ocelos, es tricromática (Valera, 1974; Huffaker y Rabb, 1984). El espectro de visión abarca de los 300 a los 650 nm (**figura 8**), percibiendo el color mediante receptores que tienen sensibilidad máxima en las regiones del ultravioleta (UV), azul y verde (Briscoe y Chittka, 2001).

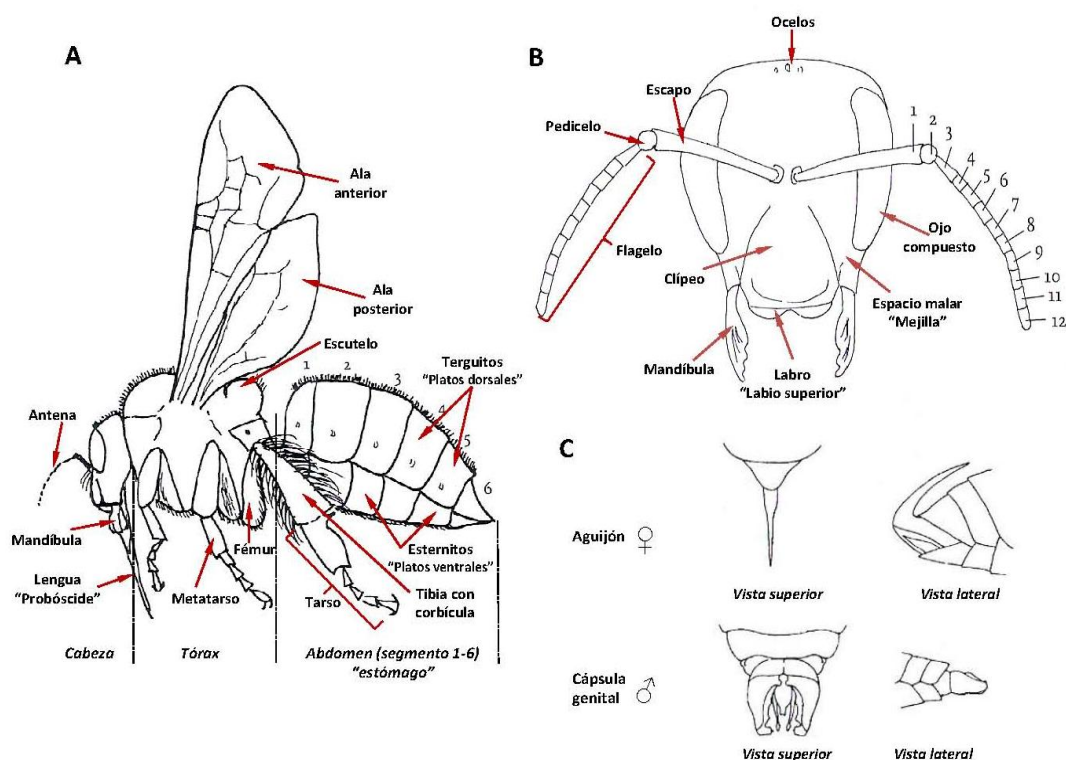


Figura 7. Esquema general de una hembra de abejorros (A y B, modificado de Benton, 2006) y genitalia de hembra y macho (C, modificado de Prys-Jones y Corbet, 1987).

Los ojos y las antenas son fundamentales para la vida de los abejorros. A pesar de que su agudeza visual se reduce a 1/80 de la humana, son capaces de distinguir diferentes configuraciones de intensidades de luz que inciden en los ojos, es decir, formas de objetos. En vuelo, aunque la velocidad habitual sea de 3 m / s, tienen una visión clara que les permite detectar el movimiento a su alrededor (Magnan, 1934). En el rango de longitudes de onda del rojo, no ven

pero, gracias a sus ocelos, si distinguen la luz polarizada. Esto explica que puedan volar cuando las marcas del campo no son visibles. La visión les ayuda a obtener información sobre las condiciones ambientales, a orientarse en el campo y a distinguir las flores por su forma, color, contraste y tamaño (Huffaker y Rabb, 1984; Chittka y Menzel, 1992; Chittka, *et al.*, 1994). Sus flores preferidas son las amarillo-naranjas, después las azules o púrpuras y, en menor medida, las blancas o rojas (Brian, 1957; Brian, 1983). Además, la visión juega un papel fundamental en el momento del apareamiento ya que, inicialmente, el encuentro es visual (Valera, 1974; Pesson y Louveaux, 1984; Free, 1987 y 1993). A través de las antenas, la detección del olor puede aumentar la discriminación del color mediante la mejora de la atención a las señales visuales y ambas señales combinadas pueden dar lugar a una mejor formación y recuperación de la memoria (Kunze y Gumbert, 2001). También, pueden reconocer individuos de una misma colmena (Matthews y Matthews, 1978), identificar polen de distintos tipos y volver a las zonas favorables (Dobson, 1994; Dobson *et al.*, 1999 y 2000), aparearse (Free *et al.*, 1982; Pouvreau, 1984; Sladen, 1912), reconocer marcas del territorio (O'Toole y Raw, 1991), realizar su actividad dentro del nido, en el que están a oscuras, y regresar a flores de las que han obtenido recompensa (Free, 1987).

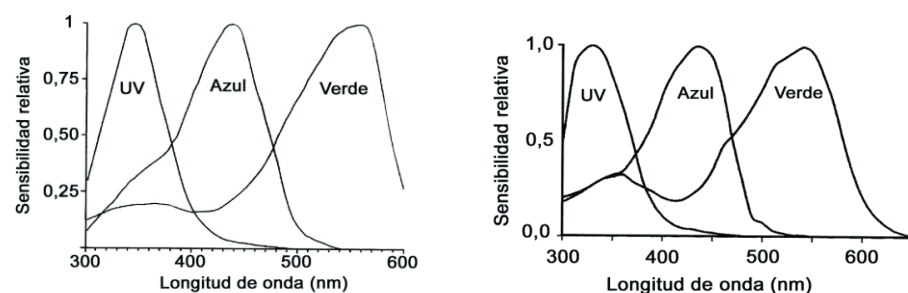


Figura 8. Sensibilidad espectral relativa en ojos compuestos de insectos polinizadores: (izquierda) abeja melífera (*Apis mellifera*) (fuente: Briscoe y Chittka, 2001) y (derecha) del abejorro (*Bombus terrestris*) (fuente: Spaethe y Briscoe, 2005).

A diferencia de la familia *Meliponinae* y el género *Apis*, casi la totalidad de las especies de abejorros tienen un ciclo anual, con una sola reina que funda una colonia. No obstante, se sabe que algunas especies tropicales de abejorros inician las nuevas colonias mediante enjambre, de una forma muy similar a las abejas de miel (Garófalo, cit. por Goulson, 2010). Es conocido, además, que las especies de clima templado tienen una homeostasis de nido (Alford, 1975) y que pueden reclutar a sus compañeras de nido, mediante una feromona de alerta, para

la búsqueda de comida (Dornhaus y Chittka, 1999; Dornhaus *et al.*, 2003; Mena-Granero *et al.*, 2005). Como es habitual en los himenópteros, son especies, en su mayoría, sociales con tres castas diferenciadas, tanto en su función, como en su momento de aparición. La reina, hembra diploide, es la encargada de iniciar la colonia y vive durante 12 ó 15 meses (Pouvreau, 1989). Las obreras, que son hembras con un aparato reproductor parcialmente atrofiado, contribuyen al mantenimiento de la colonia aprovisionándola y realizando las labores necesarias en el interior de la misma. Los machos proceden de óvulos no fecundados (haploides) de la reina o de las obreras, apareciendo en la etapa final de la colonia (Prys-Jones y Corbet, 1987 y 1991). Todos estos atributos están asociados con una sociabilidad avanzada, a pesar de que en innumerables ocasiones, y tras la descripción hecha por O'Toole y Raw (1991) de la colonia de *B. terrestris*, se les ha etiquetado como insectos “eusociales primitivos” debido a que se consideraba su organización social más simple que la de las abejas melíferas.

Si bien, la amplia distribución de la especie *B. terrestris* fue una razón importante para escogerla con fines comerciales, también fueron razones de peso las características de sus colonias y su buena adaptación a las condiciones de cría artificial (Kaftanoglu, 2000). El ciclo de vida de *B. terrestris* es anual (**figura 9**) aunque, según Maciel (1991), es posible que en nuestras latitudes se produzcan dos ciclos anuales, uno de primavera y otro en otoño, debido a la benignidad del clima que permite la existencia de flores en estas épocas. La reina nueva, una vez que ha sido fecundada en el otoño, hiberna en lugar tranquilo y seco hasta que, en primavera, con el aumento de temperatura del suelo (Prys-Jones, 1982), sale del aletargamiento y busca alimento para conseguir energía. A continuación, acondiciona un agujero, madriguera o similar, bajo tierra, recubriendo el interior con hierbas secas y fabrica una celda, con la cera segregada por las glándulas del abdomen, para almacenar polen y néctar. En otra celda, deposita la primera docena de huevos. Las primeras larvas son incubadas por la reina y, cuando aumentan de tamaño, se desarrollan en celdas independientes y son alimentadas con gotas de néctar y polen regurgitadas por la reina y por los adultos. La segunda puesta de la reina, de unos 35 huevos en grupos de siete (Heinrich, 1976), es cuidada por los primeros adultos, que no salen a volar por su pequeño tamaño (O'Toole y Raw, 1991), mientras que la reina sale a por alimento. Las puestas consecutivas son cuidadas por la reina y alimentadas por adultos que ya han

alcanzado el tamaño suficiente para realizar la labor de recolección del alimento. La reina ejerce un doble dominio en la colmena, de tal modo que controla la puesta de las obreras y no permite la existencia de nuevas reinas que hagan peligrar su liderazgo. Cuando este liderazgo se pierde, se produce el *switch point* (punto de cambio) en el nido. A partir de este momento, la reina vieja y las obreras se agreden y entran en competición; nacen nuevas reinas; las obreras ovipositan huevos haploides de los que saldrán machos y, finalmente, la reina vieja muere (López, 2005).

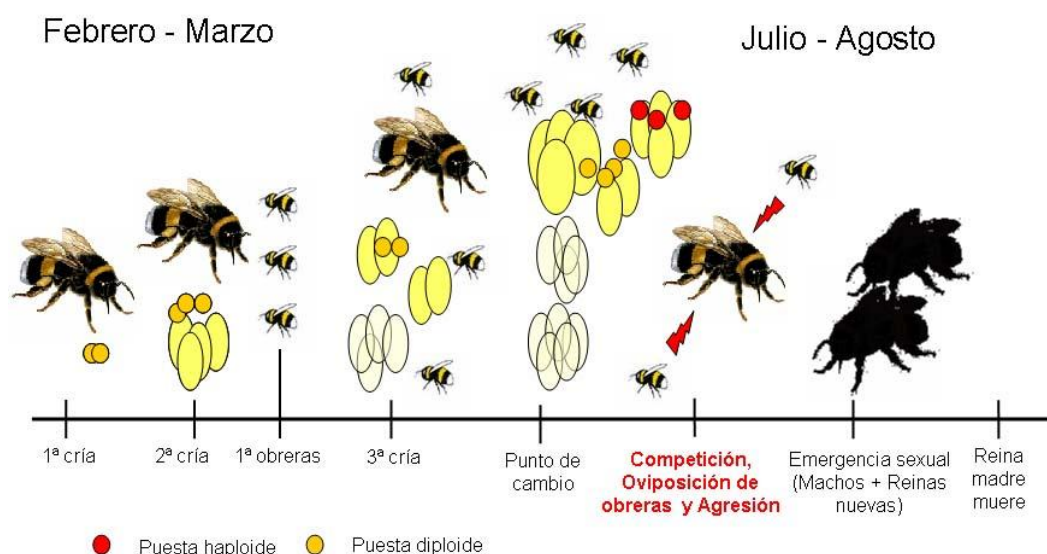


Figura 9. Esquema del desarrollo de una colonia de *Bombus terrestris* (fuente: López, 2005).

Respecto a la morfología de la especie, aunque puede tener pequeñas modificaciones entre las subespecies, se caracteriza por una coloración negra del pelo con dos bandas de color amarillo, una que cruza la parte anterior del tórax y otra en el 2º segmento abdominal. El extremo caudal es de color blanco y empieza, de forma habitual, en el 4º segmento. La reina tiene mayor tamaño, entre 20-22 mm; antenas con doce artejos; abdomen constituido por seis terguitos y seis esternitos (**figuras 7 y 10**). Las obreras presentan las mismas características morfológicas aunque son de menor tamaño, 11-17 mm. En los machos, el tamaño es intermedio, 14-16 mm; sus antenas las forman trece artejos; la región dorsal del abdomen está compuesta por siete terguitos visibles y la ventral por seis esternitos visibles y dos internos membranosos. Ellos, a diferencia de las reinas y las obreras, carecen de aguijón (Sladen, 1912; Berland, 1976; Ornosá, 1986a, 1986b). El tamaño de la larva viene determinado, genéticamente, por la casta a la que

pertenezca y, a su vez, está relacionado con la calidad y la cantidad de comida que se le proporciona (Goulson, 2003).

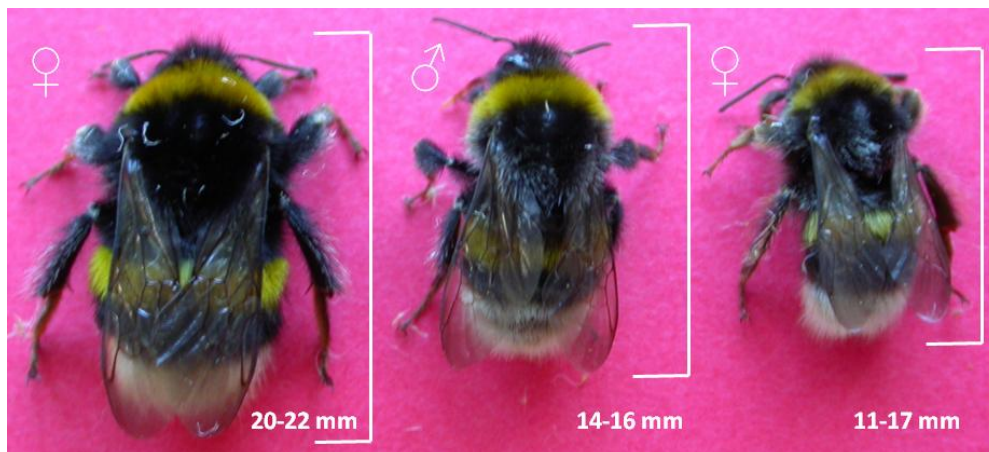


Figura 10. Anatomía externa de las castas de *B. terrestris* subsp. *terrestris*. De izquierda a derecha: reina, macho y obrera.

El abejorro es uno de los insectos habituales en nuestros campos. Su intromisión inocente en los cultivos y la observación de sus hábitos, desde finales del siglo pasado, por el que puede considerarse como el padre de su domesticación, Frederick W. L. Sladen (1912), y por una larga lista de autores, han hecho posible su difusión y explotación comercial. Al igual que su pariente, la abeja, se caracteriza por la constancia floral, puesto que cada individuo se mantiene constante a una especie floral, aunque cambie a otra en el caso de que la recompensa de las visitas disminuya (Free, 1963 y 1970; Goulson *et al.*, 1997). Desde hace mucho tiempo, se considera un excelente polinizador de diversos cultivos hortícolas (tomate, berenjena, calabacín, pimiento), herbáceos (la alfalfa, el trébol rojo), frutales (kiwi, el níspero, el aguacate o el almendro), así como de plantas ornamentales (McGregor, 1976; Macfarlane *et al.*, 1983; Macfarlane y Ferguson, 1983; Pouvreau, 1984; Corbet *et al.*, 1991; Griffin *et al.*, 1991; Ish-Am *et al.*, 1998; Thomson y Goodell, 2001; McNeil y Pidduck, 2003). Dicha excelencia se debe a que, como la abeja, es un insecto social que realiza la recolección para la comunidad, por lo que presenta una tasa de visitas a flores más elevada que otros insectos. Además, al igual que algunas abejas silvestres, exceptuando la abeja melífera, puede realizar la llamada “polinización por zumbido”, también conocida como recolección vibratoria de polen. Este tipo de polinización es realizada en especies, como la borraja, el tomate o el kiwi, cuyas flores se caracterizan por no producir néctar, por poseer unos pétalos curvados, un polen seco y unas anteras de colores brillantes con un agujero en el extremo, que

no permite la caída del polen por sí mismo. Si el insecto que las visita desacopla las alas y da con la frecuencia correcta para vibrar las anteras, el polen saldrá y cubrirá al insecto (Buchmann, 1983; Corbet *et al.*, 1988; Harder y Barclay, 1994).

A dichas cualidades hay que añadir otras, que lo diferencian de la abeja: la capacidad de recolectar polen y néctar en un mismo vuelo (Heinrich, 1979), con preferencia por un néctar muy concentrado (Prys-Jones, 1982); la presencia de una lengua más larga que les permite alcanzar el néctar en flores “profundas” (por ejemplo, la judía) a las que no puede acceder la abeja (Kirk, 2004); la recolección de alimento durante periodos de tiempo más largos (Willmer, cit. por Kirk, 2005); en la mayoría de las especies, la combinación de un tamaño de cuerpo grande con un aislamiento de pelos densos les permite sufrir endotermia, por lo que están bien adaptados para la actividad en condiciones frías (Heinrich, 1993), mientras que las abejas disminuyen su actividad con el viento, la lluvia o con temperaturas extremas (Holcroft y Allan, 1994).

Las primeras introducciones de abejorros en invernadero se realizaron en Bélgica, a lo largo del año 1987 (Navez, 1989; van der Eijnde *et al.*, 1991; van der Ravestijn y van der Sande, 1991), para después extenderse a Holanda, Francia (Navez y Budin, 1990), Gran Bretaña, Italia (Lama y Poletti, 1993), España (Navarro-Castillo, 1993), otros países europeos y otros continentes (Estay *et al.*, 2001). Dichas introducciones se realizaron, gracias al inicio de la producción comercial de colmenas, por la empresa belga Biobest, en 1987. Al año siguiente, su iniciativa fue seguida por las compañías holandesas Koppert Biological Systems, que desde 1967 ya era productora de organismos de control biológico, y Bunting Brinkman Bees (BBB). Desde entonces, más productores iniciaron la cría de abejorros aunque, al final, sólo unos pocos han sobrevivido al mercado competitivo. Hoy existen alrededor de 30 productores en todo el mundo, pero la mayor parte de la participación del mercado mundial está al amparo de Koppert, Biobest y la empresa española Agrobío S.L. Las grandes compañías tienen instalaciones tanto en su tierra natal como en otros países y continentes, que suelen tener el mismo nombre. Allí, ocasionalmente, y en exclusividad, crían las colonias para el mercado local usando especies nativas (Velthuis y van Doorn, 2006).

En la actualidad, con fines comerciales, se crían cinco especies de abejorros:

- *B. impatiens*, para la zona este americana.
- *B. occidentalis*, para el oeste americano.
- *B. ignitus*, para el este de Asia (Japón y el Sur de Corea) y China.
- *B. lucorum*, también para China.
- *B. terrestris*, siendo la principal debido a su distribución cosmopolita.

De esta última, aunque en un principio se inició la producción a nivel industrial de todas sus subespecies, hoy sólo se producen las subespecies *canariensis*, *audax*, *terrestris* y *dalmatinus* (Kaftanoglu, 2000; Velthuis y van Doorn, 2006). Tanto de la primera, como de la segunda subespecie, el nivel de producción es muy escaso, debido a la exclusividad de su distribución. En relación a las otras dos, la subespecie *terrestris* es la que, en los inicios, se eligió para su comercialización, ya que estaba presente de forma natural en tres continentes. Sin embargo, el hecho de que sus colonias e individuos tengan un menor tamaño que la subespecie *dalmatinus*, ha hecho que, a lo largo del tiempo, las empresas lo hayan sustituido en sus producciones.

En cuanto a la producción industrial de las colmenas que se comercializan, las colonias se desarrollan en unos nidos con buena ventilación, hechos de cartón o plástico, con independencia de la subespecie. Las características de los nidos son comunes en todas las compañías productoras; no obstante, se diferencian en la forma, tamaño y color de las colmenas comerciales. Generalmente, los nidos están protegidos con una caja de cartón reforzado que permite regular la temperatura de la colonia, evita la humedad por condensación y facilita un almacenaje en palés para su transporte (**figura 11**). En dicha caja se localiza un sistema de entrada y salida con dos posiciones: una, que permite circular a los abejorros en ambos sentidos, y otra, que sólo permite la entrada a la colmena. Una colonia comercial está compuesta por una reina, unas 70 u 80 obreras (aunque este número puede variar según el destino de la colmena) y larvas en diferentes estados de desarrollo. Además, suele llevar una pequeña cantidad de polen y una bolsa con un jarabe o mezcla azucarada, sobre la que se localiza el nido. De este modo, la colmena se mantendrá en perfecto estado hasta su llegada al cultivo.

La descripción de la especie, así como algunos aspectos de su producción y comercialización, refleja su robustez para realizar la polinización asistida necesaria en los cultivos protegidos y explica que, en las dos últimas décadas, su uso haya desbancado a otros métodos artificiales debido a que han ayudado a

reducir el gasto en mano de obra, maquinaria y productos fitosanitarios (Roldán-Serrano y Guerra-Sanz, 2004). Además, elimina los problemas de deformaciones y enfermedades criptogámicas en los cultivos, producidos por el uso de fitorreguladores, así como los daños producidos en la planta cuando se aplica polinización por vibración o aplicando aire (Navarro-Castillo, 1993). Sin embargo, no hay que olvidar que, para que los resultados sean óptimos, cuando se realiza la introducción en el cultivo y, en especial, cuando se someten a espacios cerrados, deben aplicarse las siguientes recomendaciones:

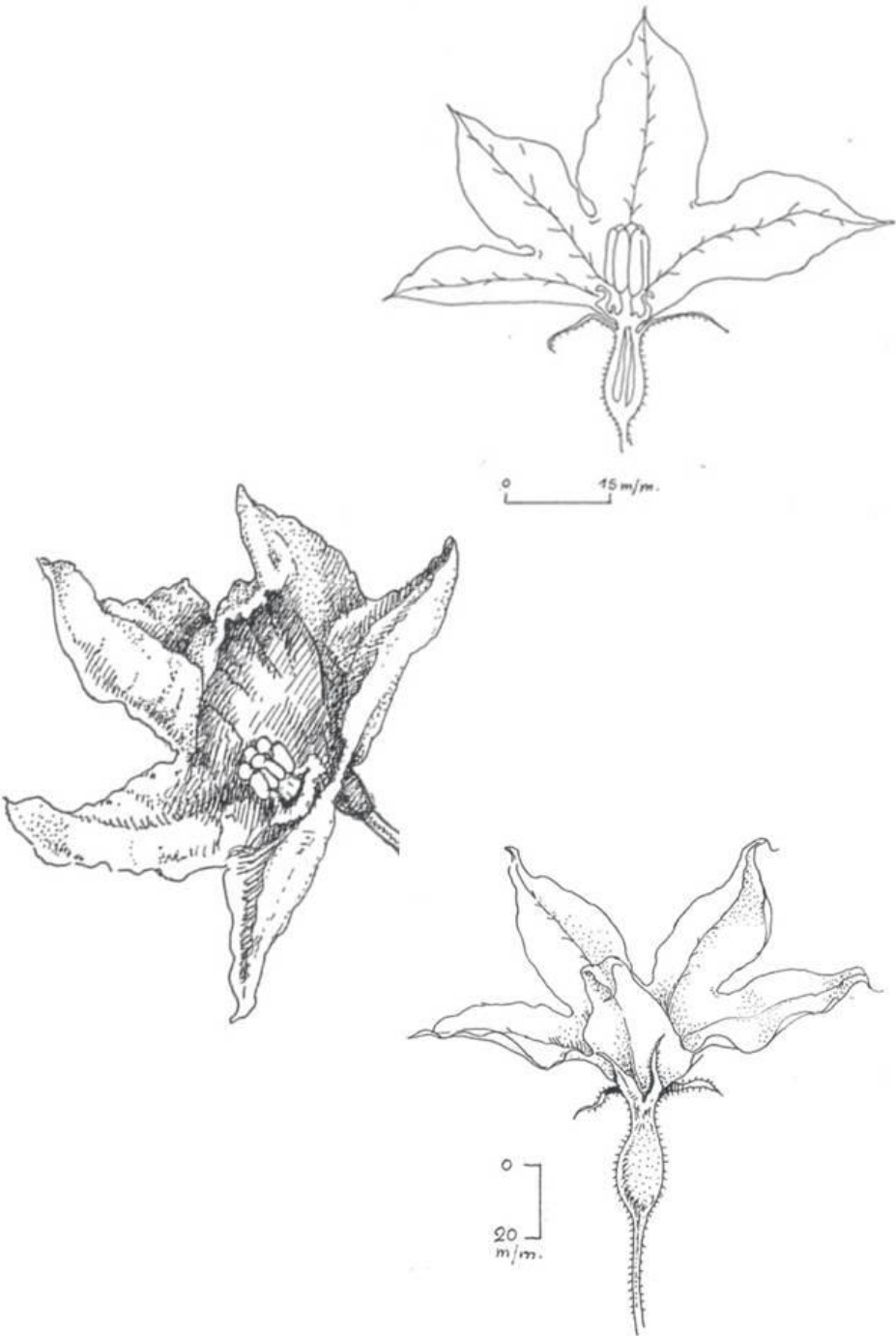
- a) Las condiciones ambientales dentro del invernadero deben ser buenas, evitando condiciones extremas: de temperatura, que producen desequilibrios en la planta y repercuten en una mala calidad de polen; de humedad alta, porque apelmaza el polen y favorece el desarrollo de enfermedades; y de cambios de presión, porque afectan al comportamiento en vuelo de los abejorros.
- b) Los invernaderos de estructuras altas con cámara de aire mejoran la ventilación y permiten los vuelos rápidos de los abejorros.
- c) Las mallas aislantes evitan que los abejorros salgan del invernadero, sobre todo, en periodos de floración de especies muy atractivas para ellos (por ejemplo, romero o níspero japonés).
- d) No se deben tener varios cultivos en el mismo invernadero porque, según cuales sean, los abejorros pueden mostrar distintas apetencias.
- e) La plantación debe ser lo más homogénea posible, lo cual permite que los abejorros visiten por igual todos los puntos del invernadero.
- f) Los tratamientos fitosanitarios aplicados deben ser compatibles con los abejorros.



Figura 11. Colmenas comerciales de abejorros en cultivo de pimiento tipo “california”.

En la horticultura intensiva del sureste español, el empleo rutinario de estos insectos por una porción del gremio agrícola ha contribuido, en gran medida, al rápido abandono del uso indiscriminado de fitosanitarios. A su vez, ha permitido la adopción paulatina del uso de organismos de control biológico, desde el año 2007, como parte de los Programas de Producción Integrada exigidos por los consumidores y el sector hortofrutícola europeo porque el agricultor ha aprendido a realizar los tratamientos contra plagas y enfermedades con el mínimo impacto sobre la vida de los insectos auxiliares.

INTERÉS Y OBJETIVOS



INTERÉS Y OBJETIVOS

Las hortalizas procedentes de invernadero dan lugar a elevados beneficios económicos para los agricultores del sureste español, sobre todo cuando se comercializan como productos “fuera de temporada”. Sin embargo, debido a las exigencias de los últimos años provenientes de las grandes plataformas comercializadoras, de la UE y de los consumidores, se hace necesaria la mejora de la competitividad de las hortalizas españolas en los mercados. Con esta finalidad, deben utilizarse las técnicas más avanzadas y naturales, ya que la población ha tomado conciencia del daño causado a los ecosistemas por ciertas prácticas culturales inadecuadas y exigen, desde el punto de vista ambiental, una actitud más responsable.

Actualmente, los productos hortícolas españoles sufren la competencia de países mediterráneos extracomunitarios (Marruecos, Turquía, Egipto,...), cuyo calendario de producción solapa con el nuestro. Estos países se abren al mercado gracias a los reducidos costes de mano de obra. Ante esta situación, la competitividad de la horticultura española viene marcada por la calidad del fruto, unida a la sostenibilidad ambiental de su producción y, sobre todo, a la seguridad alimentaria tan demandada por el consumidor.

Como ya se ha puesto de manifiesto con anterioridad, la producción hortícola bajo plástico presenta numerosos obstáculos que dificultan la obtención de esta calidad. Si bien es cierto que, en los últimos diez años, se han obtenido mejoras evidentes con la tecnificación y las buenas prácticas en diversas técnicas culturales, todavía no se han agotado todas las herramientas de desarrollo e innovación. Entre ellas, hay que tener en consideración la biología reproductiva y las características florales de las especies hortícolas que se desean producir, ambas estudiadas desde el punto de vista de la posible necesidad de vectores de polinización, así como las dificultades que la producción bajo plástico introduce en ambos factores.

En la presente tesis doctoral se evalúa la eficiencia del uso de un vector de polinización, el abejorro (*Bombus terrestris*, L.), ya empleado de forma indispensable y exitosa en el cultivo de tomate en invernadero, con el objetivo de extender su utilización en el resto de cultivos hortícolas, para mejorar la

producción y la calidad de sus frutos. De los posibles cultivos que se desarrollan en esta horticultura intensiva bajo plástico, se han seleccionado dos con problemáticas distintas.

Por una parte, se ha escogido el **calabacín** (*Cucurbita pepo*, L.) puesto que para inducir su fructificación, debido a su biología reproductiva, se aplican fitohormonas o bioestimulantes de forma habitual (Céspedes *et al.*, 2009). En consonancia con la conciencia medioambiental de los consumidores, que en última instancia son los que compran, las comercializadoras han optado por rechazar esta técnica de cultivo, aun cuando se respete el Límite Máximo de Residuos (LMR). Estas exigencias plantean un importante reto para el agricultor a la hora de obtener fruto.

El calabacín, planta tropical originaria de México, perteneciente a la familia de las cucurbitáceas, se caracteriza por ser monoico con flores diclinas, por considerarse “superproductor” de néctar y poseer como vectores específicos de polinización a abejas solitarias de gran tamaño, de los géneros *Peponapis* y *Xenoglossa* (**figura 12**), ausentes en nuestras latitudes (Krombein *et al.*, 1979; Nepi, 2005). Ante esta situación y aprovechando la capacidad que presenta esta planta para producir frutos partenocárpicos, durante años se ha optado por la inducción de dichos frutos mediante la aplicación de fitohormonas. Esta técnica presenta diversos inconvenientes, entre los que destaca un alto coste en mano de obra, ya que esta planta produce flores a diario, de forma continua a lo largo de todo el ciclo de cultivo, por lo que el número de aplicaciones semanales es muy elevado. Hay que tener en cuenta, además, el coste de la fitohormona. El uso de estos productos provoca malformaciones en el fruto y un envejecimiento prematuro de la planta, causado por una continua fructificación (Rylski y Aloni, 1991; Robinson y Reiners, 1999). Otro factor a considerar es el cumplimiento de los plazos de seguridad de persistencia del producto en fruto que, generalmente, superan el tiempo de recolección por lo que, cuando el calabacín llega al consumidor, aún quedan restos del producto.



Figura 12. Varias obreras de *Peponapis pruinosa* (izquierda: www.bridgerlandaudubon.org) tomando néctar de una flor femenina de calabacín y una obrera de *Xenoglossa strenua* (derecha: www.dicoverlife.org) cubierta de granos de polen.

Para dar respuesta a las nuevas exigencias de los mercados y eliminar el uso de estas fitohormonas en el cultivo del calabacín bajo invernadero, en esta tesis doctoral se plantea el uso de abejorros como una alternativa eficaz a la aplicación de estas sustancias, en ausencia de sus polinizadores naturales, por las innumerables ventajas que se exponen a continuación. Se ha elegido este polinizador porque, además de que ya está demostrado su buen hacer en otros cultivos y su disponibilidad comercial, se espera una buena respuesta ante los atractivos florales del calabacín. El abejorro, de mayor tamaño que la abeja melífera, puede transportar y homogeneizar el polen con mayor facilidad sobre el gran estigma de las flores de esta especie. Además, una obrera de abejorro puede recolectar néctar o polen en un mismo vuelo sin sentirse incómoda tras cubrir su cuerpo con el polen pegajoso, a diferencia de las abejas melíferas, incrementando así las posibilidades de una polinización exitosa (Skinner y Lovett, cit. por Nepi, 2005). Por otra parte, está descrito que las flores con néctares ricos (ratio sacarosa / hexosas = 0,5 a 0,99) o dominantes en sacarosa (ratio sacarosa / hexosas > 1), tienen asociadas abejas de gran tamaño como polinizadores (Baker y Baker, 1983a, 1990; Lammers y Freeman, 1986). Por tanto, nuestra hipótesis se basa en que la presencia de determinados atractivos florales aumentan las visitas del polinizador, con el consecuente incremento del número de semillas en fruto y de la mejora de la cosecha. En este caso, el uso del abejorro se presentaría como una alternativa interesante, con resultados, al menos, equivalentes a los obtenidos por el agricultor en la actualidad. Para responder a la hipótesis presentada, se plantearon los siguientes trabajos: a) evaluar la dinámica del néctar y su composición en azúcares en distintos cultivares de calabacín, durante la antesis floral, y b) evaluar la actividad polinizadora del abejorro en diversos cultivares de

calabacín. Dichos trabajos se engloban en el **artículo 1** de esta tesis, “**Reward attractions of zucchini flowers (*Cucurbita pepo*, L.) to bumblebees (*Bombus terrestris*, L.)**”.

Por otra parte, se ha seleccionado el **pimiento** (*Capsicum annuum*, L.), perteneciente a la familia de las solanáceas, como ejemplo de cultivo en el que es posible alcanzar una mejora en la producción y en la calidad del fruto mediante la introducción de un polinizador (de Ruijter, *et al.*, 1991; Kristjansson y Rasmussen, 1991; Kubisová y Haslbachová, 1991; Rabinowitch *et al.*, 1993; Shipp *et al.*, 1994; Porporato *et al.*, 1995; Abak *et al.*, 1997; Jarlan *et al.*, 1997a, b, c; Meisels y Chiasson, 1997; Raw, 2000; Dag y Kammer, 2001; Roldán-Serrano *et al.*, 2002a; Roldán-Serrano y Guerra-Sanz, 2003; Guerra-Sanz y Roldán-Serrano, 2004; Cruz *et al.*, 2005), a pesar de que, *a priori*, este cultivo no presenta problemas tan evidentes de producción.

El pimiento es una planta originaria de América, muy sensible a temperaturas extremas, con flores solitarias y monoclinas (Dellaporta y Calderón-Urrea, 1993) que presentan, según la especie y variedad, nectarios (Martin *et al.*, 1932), producción de néctar (Rabinowitch *et al.*, 1993) y cambios de coloración, tanto en anteras como en pétalos, que son atractivos para polinizadores inespecíficos (**figura 13**). Las anteras, a diferencia de las de sus especies hermanas, tomate y berenjena, se caracterizan por una dehiscencia longitudinal que permite una fácil caída del polen, sin necesidad de vibrarlas. Por ello, se le considera autógamo. Sin embargo, el hecho de que sus órganos reproductivos femenino y masculino presenten cierta asincronía en la maduración, plantea que su sistema reproductivo presente diferentes tasas de alogamia, en función de la especie y la variedad (Odland y Porter, 1941; McGregor, 1976; Nuez *et al.*, 1996). Generalmente, en las formas domésticas y no domésticas, con fruto pequeño, y en las variedades cultivadas de fruto grande, el estigma sobresale por encima de las anteras, por lo que hay predisposición a la alogamia. Sin embargo, en las variedades cultivadas de frutos globosos y carne gruesa, el estilo suele ser más corto favoreciendo un mayor grado de autogamia (Nuez *et al.*, 1996).



Figura 13. Caracteres florales de *Capsicum annuum*. Izquierda: sección transversal de la flor en pre-antesis. Derecha arriba: detalle de las gotas de néctar y coloración de anteras. Derecha abajo: marcas de color en los pétalos del ají amarillo (fuente: www.blogspot.com).

El pimiento no tiene grandes problemas de cuajado. Sin embargo, debido a las características antes descritas y a que sus frutos son multiseñados, en ciertos momentos se producen déficits de polinización que provocan una reducción en el número de semillas y, como consecuencia, una merma en el tamaño y la calidad de los frutos, así como en la producción (Picken, 1984; Sawhney, 1984).

Como ya se adelantó en la introducción, el cultivo de pimiento, en un invernadero del sureste español, sufre limitaciones en sus procesos fisiológicos, sobre todo a finales de verano (etapa temprana de crecimiento en la que las temperaturas pueden superar los 40 °C) y en invierno (temperaturas nocturnas inferiores a 16 °C), que dan lugar a mermas de producción y de calidad, debido a que la floración y el cuajado de frutos son afectados por la disparidad extrema del clima (Thompson y Kelly, 1957; Ryłski, 1985 y 1986; Polowick y Sawhney, 1985; Lurie *et al.*, 1986; de Ruijter *et al.*, 1991; Khah y Passam, 1992; Aloni *et al.*, 1994, 1995 y 1999; Mercado *et al.*, 1997a, 1997b; Pressman *et al.*, 1998a, 1998b). A su vez, se acentúan los déficits de polinización porque no se utiliza ninguna técnica de polinización asistida. Aun así, se ha encontrado una influencia positiva del uso de polinizadores en la producción de frutos de pimiento en condiciones de temperaturas subóptimas (Pressman *et al.*, 1998a), en situaciones de calor (Marcelis y Hofman-Eijer, 1997; Aback *et al.*, 1997) y en invernaderos

de cristal, en Holanda, con clima de otoño y de verano (de Ruijter *et al.*, 1991). En consecuencia, con el fin de evitar dichos déficits y asegurar una calidad de fruto que mejore la rentabilidad del cultivo de pimiento bajo plástico, se plantea como remedio el uso de abejorros, pues ya han sido probados con éxito en otras partes del mundo (Shipp *et al.*, 1994; Porporato *et al.*, 1995; Abak *et al.*, 1997; Dag y Kammer, 2001).

Al igual que en el caso del calabacín, la presencia de atractivos florales (olores, guías de nectario, néctar, polen,...) en pimiento es evidente. No obstante, han sido objeto de escasa atención científica. Por esta razón, y desde el punto de vista de la aplicación comercial de los abejorros, en el **artículo 2, “Dynamics and sugar composition of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) nectar”**, se planteó el estudio de algunas de las características de la biología floral del pimiento: antesis floral, viabilidad del polen, viabilidad del estigma y, fundamentalmente, la dinámica del néctar, en distintos cultivares comerciales de pimiento dulce, por ser el más cultivado en la provincia de Almería, así como su composición en azúcares. Con este fin, se midieron los volúmenes de néctar producidos a diferentes horas del día, así como en distintos meses de cultivo y durante la antesis floral.

Como ya se ha indicado, existen varios trabajos en los que se evalúa la frecuencia de las visitas de un polinizador para mejorar la producción y calidad del pimiento. Sin embargo, en ellos no se presta atención a la eficacia de la visita del polinizador respecto al polen depositado en estigma de la flor. Ambos parámetros son usados para evaluar la efectividad de los polinizadores. No obstante, los investigadores enfatizan más el primero, puesto que es menos tedioso que evaluar la transferencia de polen a la flor (Waser *et al.* y Dilley *et al.*, citados por Fenster *et al.*, 2004). En este sentido, se presenta el **artículo 3, “Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination”**, en el que se estudió la deposición de granos de polen en el estigma, teniendo en cuenta que la cantidad de polen depositada debe estar relacionada con las visitas del vector que reciba la flor, afectando al número de semillas formadas en el fruto y, por ende, a la calidad del mismo, en términos de tamaño y forma. Bajo esta hipótesis, se estimó el número de visitas del abejorro necesarias para la inducción de fruto y se estableció el efecto de dichas visitas, así como el de la duración acumulada de éstas, en el porcentaje de semillas producidas y en la

calidad del fruto. Ambos parámetros se evaluaron tanto en presencia como en ausencia del polinizador.

Desde los inicios de la agricultura, los abejorros siempre han estado acostumbrados a la compañía del hombre. De hecho, varias especies tienen sus hábitats en parques y jardines, y muchas de las especies más comunes se encuentran en zonas urbanas y periurbanas (Alford, 1975; Goulson, 2010). En este sentido, el trabajar con abejorros en invernadero supone una tranquilidad añadida para el agricultor, ya que no suelen picar al hombre, salvo que se sientan amenazados. Esto no ocurre con las abejas, mucho más agresivas por naturaleza y, sin embargo, domesticadas desde la antigüedad, con el fin de conseguir uno de los manjares más preciados, la miel.

Otro de los motivos que ha propiciado la elección del abejorro, a pesar de los resultados satisfactorios encontrados con abejas, es su sencillo manejo. Las colmenas de abejorros se transportan sin dificultad porque su tamaño aproximado es el de una caja de zapatos, con el doble de profundidad, debido a que sus nidos son mucho más pequeños. Además, es muy fácil abrirlas y cerrarlas, en caso de necesidad, sin mucha instrucción. Por contra, las colmenas de abejas, debido a su agresividad, sólo deben manipularse por personal especializado, mediante aparejo específico, y transportarse cuando el sol está oculto.

Ante los planteamientos descritos, los objetivos de esta tesis son:

1.- Evaluar la eficiencia polinizadora de *B. terrestris* (L.), en los cultivos de calabacín y pimiento cultivados bajo plástico, mediante:

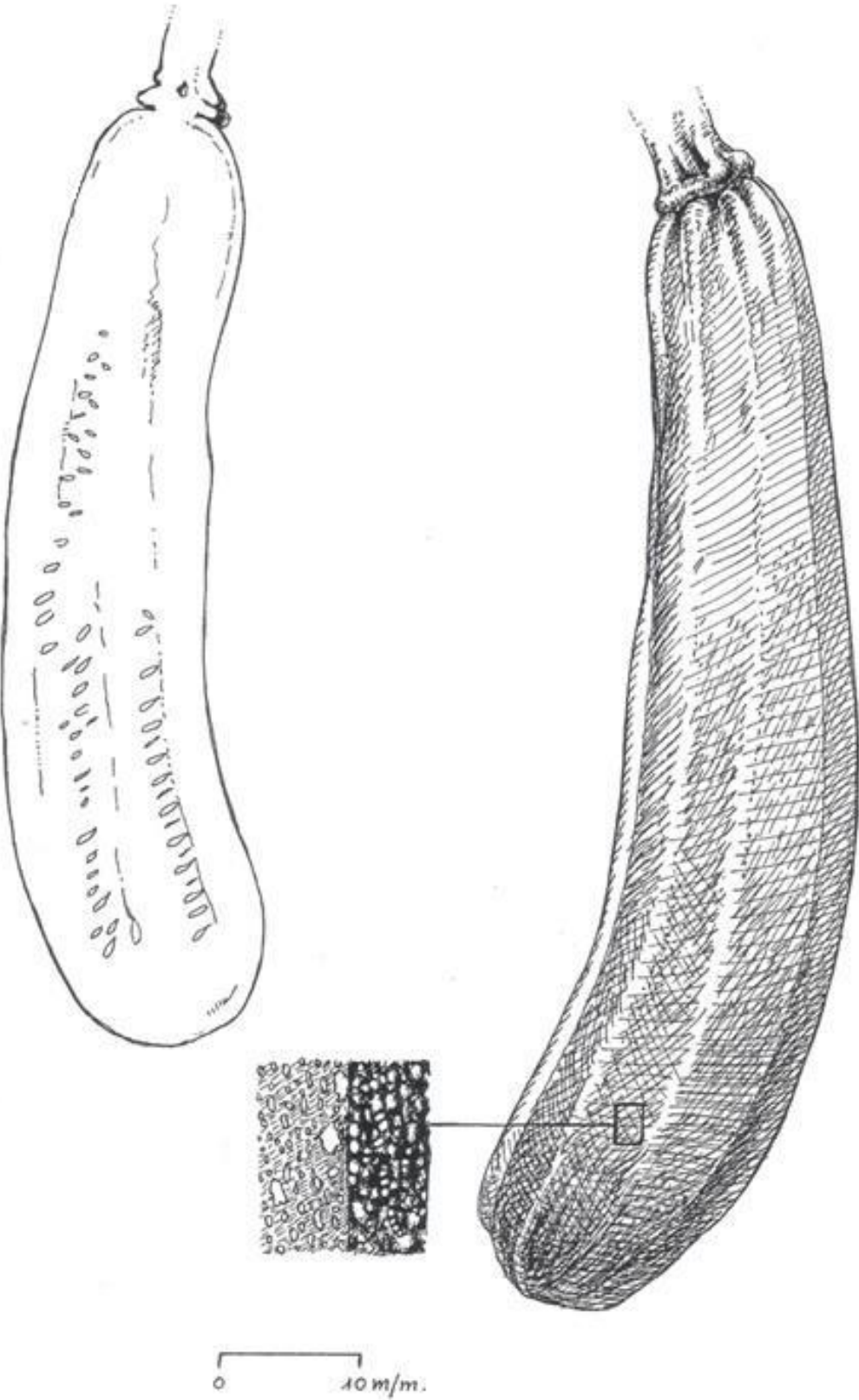
1.1.-Estudio de algunas de las características de la biología floral (producción de néctar y su composición, tamaño de corola, anthesis floral, maduración de los órganos sexuales) del calabacín y del pimiento en relación con la presencia del abejorro, con el fin de promover una polinización eficiente.

1.2.-Descripción de la actividad polinizadora del abejorro en calabacín y pimiento bajo condiciones de invernadero.

1.3.-Estudio del efecto de la actividad del abejorro en la calidad y producción de los frutos de calabacín y pimiento.

2.- Valorar si los resultados obtenidos en calabacín y pimiento pueden ser un argumento para fomentar el uso de abejorros en el resto de hortalizas cultivadas bajo plástico en el sureste español.

ARTÍCULOS



ARTÍCULO 1

**“REWARD ATTRACTIONS OF ZUCCHINI FLOWERS
(*Cucurbita pepo*, L.) TO BUMBLEBEES (*Bombus terrestris*, L.)”**

Autores:

Ana Roldán Serrano y José M. Guerra-Sanz

**Artículo publicado en *European Journal of Horticultural Science*
(2005), 70 (1): 23-28. (Factor de impacto en JCR: 0,46)**



Reward Attractions of Zucchini Flowers (*Cucurbita pepo* L.) to Bumblebees (*Bombus terrestris* L.)

A. S. Roldán-Serrano¹⁾ and J. M. Guerra-Sanz²⁾¹⁾Agrobío, S.L., La Mojonera, Almería and ²⁾CIFA La Mojonera, La Mojonera, Almería, Spain)

Summary

In many fruit and vegetable crops, the number of bee visitations to receptive flowers can be the limiting step in obtaining optimal yields. Increasing the attractiveness of flowers to bees could increase visitation and provide a means of improving fruit yields and seed production. Nectar volume and sugar composition of male and female flowers of four cultivars of *Cucurbita pepo* L. (zucchini) pollinated by bumblebees were examined in a greenhouse environment. The number of visits to flowers, the number of seeds produced by visited flowers, and the sugar composition of nectar was determined during the spring. Patterns of nectar sugar composition, albeit being always sucrose rich, varied along the months of culture. There were no statistically significant differences among cultivars for the nectar sugar concentration. However, differences were observed between cultivars for the ratio of nectar sucrose/hexose. The number of seed set per visited female flower was correlated with the number of bee visits. Increased frequency of bee visits was correlated with higher volumes of nectar and with higher ratios of sucrose/hexose, which appeared to be useful indicators of pollinator preferences.

Key words. insect pollination – nectar – sugars – flower attraction – bumblebee visits – flower anthesis – sucrose/hexose ratio.

Zusammenfassung

Anziehungskraft von Zucchini Blüten (*Cucurbita pepo* L.) auf Hummeln (*Bombus terrestris* L.) Bei vielen Obst- und Gemüsearten kann die Anzahl der Insektenbesuche bei empfängnisbereiten Blüten der begrenzende Faktor für eine optimale Erntemenge sein. Die Steigerung der Attraktivität der Blüten für Insekten könnte die Besuchszahlen erhöhen und eine Methode zur Steigerung der Ernte- und Saatgutmenge darstellen. Unter Gewächshausbedingungen wurde die Nektarmenge und die Zuckerzusammensetzung bei männlichen und weiblichen Blüten von vier Zucchini-Sorten (*Cucurbita pepo* L.), die von Hummeln bestäubt wurden, untersucht. Erfasst wurden die Anzahl Besuche pro Blüte, die Anzahl Samen pro besuchter Blüte und die Zuckerzusammensetzung während des Frühjahrs. Die Muster der Zuckerzusammensetzung im Nektar, wenngleich immer reich an Saccharose, variierte während der Kulturmonate. Es waren keine statistischen Unterschiede zwischen den Sorten hinsichtlich Zuckerkonzentration des Nektars nachweisbar. Allerdings wurden Sortenunterschiede beim Verhältnis von Saccharose/Hexose im Nektar beobachtet. Es bestand eine Korrelation zwischen dem Samenansatz pro besuchter weiblicher Blüte und der Anzahl Hummelbesuche. Eine erhöhte Frequenz von Hummelbesuchen war mit größerer Nektarmenge und höheren Saccharose/Hexose-Verhältnissen korreliert, was geeignete Indikatoren für die Vorlieben des Bestäubers zu sein scheinen.

Introduction

Zucchini are grown in Southern Spain and other Mediterranean zones under greenhouse conditions as an extra-early crop because of the high revenues the crop generates. In this type of culture, fruit set is obtained by stimulation of parthenocarpic fruit development via plant growth regulators. Use of these plant growth regulators can result in the production of malformed fruit (RYLSKI and ALONI 1991; ROBINSON and REINERS 1999). Insect-mediated pollination is an alternative means of effecting fruit development. However, few studies have been conducted to examine the factors affecting zucchini pollination by bumblebees (*Bombus ter-*

restris L.) in a greenhouse environment. Thus, these means of stimulating fruit developments are not widely used by farmers.

Floral attributes, such as corolla size, corolla colour, size and shape of flower organs, nectar guides, nectar volume, quantity and quality of nectar, and pollen volume, are considered important factors influencing bee attraction and as such can affect visitation frequency (MCGREGOR 1976; FAHN 1979; DOBSON et al. 1990). Nectar sugar composition is typically characteristic of a given pollinator syndrome, BAKER and BAKER (1990) studied the relationship between the chemical composition of nectars and the type of animal pollinator. They stated that the sucrose/(glucose+fructose) ratio and

the structure of the flower or of the inflorescence are able to indicate the guild of pollinator. They distinguished four types of nectar:

1. hexose-dominated nectars, where $S/(G+F) < 0.1$;
2. hexose-rich nectars that are characterized by $S/(G+F) = 0.1$ to 0.49 ;
3. sucrose-rich nectars form with a ratio of $S/(G+F) = 0.5$ to 0.99 ; and
4. sucrose-dominated nectars are characterized by a ratio $S/(G+F) > 1$.

The first two types of nectar are characteristic for flowers visited by small bees. Large bees are associated with flowers that produce the latter two types of nectar. The nectar sugar composition of a particular species can be used to predict pollinator types, even in the absence of observable floral visitors (LAMMERS and FREEMAN 1986). The frequency of bee visitations depends on genetic as well as environment factors (WOLF et al. 1999). A high variation in the attractiveness of flowers from different species reflects diverse genetic variability.

Cucurbita pepo L. (zucchini) is a monoecious entomophilous species native to tropical Mexico. Various aspects of its floral and reproductive biology have been studied (NEPI and PACINI 1993; NEPI et al. 1996). The native pollinators of this crop species are solitary bees of the genera *Peponapis* and *Xenoglossa*, which specialize in its flowers because they feed their brood with *C. pepo* pollen (KROMBEIN et al. 1979). This specialization suggests that the flowers of *C. pepo* yield significant food rewards for these pollinators, and they have been classified as 'superproducers' because of the great amount of nectar they produce (NEPI et al. 2001). In Europe, field-planted zucchini is pollinated by honey-bees and bumblebees (NEPI and PACINI 1993; ROLDÁN-SERRANO et al. 2002). Nevertheless, little information is available regarding pollination requirements of zucchini by bumblebees.

The study reported here, together with that of ROLDÁN-SERRANO et al. (2002), was designed to characterize genetic variability in the attractiveness of flowers within commercial cultivars of zucchini to bumblebees and to define the potential parameters controlling this trait.

Material and Methods

Plant material and experimental design

The experimental design was the same as described in ROLDÁN-SERRANO et al. (2002). Briefly, four commercial zucchini cultivars (cvs. 'Elite', 'Afrodite', 'Cora' and 'Zuchino') were used in this study. The study was car-

ried out in the spring of 2002. Sixteen plants per cultivar of 10 day-old seedlings were transplanted at a plant density of 1 plant m^{-2} into a polycarbonate greenhouse with automatic ventilation and screened windows to prevent bumblebees from escaping. Plants were fertilized as necessary.

Bumblebee visits

The number of flowers visited by bumblebees from a commercial bumblebee hive located inside the greenhouse, was recorded following the method of WOLF et al. (1999). The observations of flower visits by bees were made during anthesis time, which in zucchini flowers goes from 6:00 a.m. until noon approximately (NEPI et al. 1996). The hive was equidistant from each cultivar and the plants were set in a random pattern. Each visited flower was labelled with the number of visits and the date. These visited flowers set fruits and they were left on the plant for two weeks, when they were collected and their number of seeds recorded.

Nectar analysis

As in a previous study (ROLDÁN-SERRANO et al. 2002), nectar from flowers was sampled at least three times during anthesis and its volume recorded and the sample kept frozen at $-20^{\circ}C$ until analysis. Nectar sugar analysis was performed according to NEPI et al. (1996).

Statistical analysis

One-way or factorial ANOVA was applied in the analysis of nectar volume, sugar content, and other variables. Averages comparison was carried out, when possible, using Fisher's test (LSD). All sugars were analysed with a multifactorial ANOVA. The factors were gender, variety, and harvest sample hours. The Statgraphics Plus 4.0 computer program was used for all analyses.

Results

The greatest number of seeds was produced by two visits of the pollinator, followed by three visits and then by one (Table 1). The ANOVA P-value indicated no significant differences between the numbers of seeds produced per flower at the various frequencies of bee visitation. However, the Kruskal-Wallis test indicated a statistically significant difference amongst the mean numbers of seeds produced per flower at the various frequencies of visitation at the 95,0 % of confidence level (Table 1).

Table 1. Number of seeds per fruit produced by bumblebee visits and statistical analysis.

Number of visits	Average of seeds per fruit	Anova P-Value	Kruskal-Wallis P-Value
1	85,841 ^a	0,0757	0,0487399
2	152,375 ^b		
3	135,571 ^a		

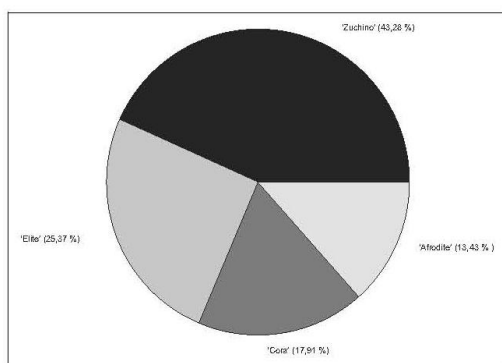


Fig. 1. Percentage of recorded visits of bumblebees per cultivar.

The preference of bumblebees for the individual cultivars used in the study is shown in Fig. 1. Cv. 'Zuchino' was most frequently visited followed by cv. 'Elite', cv. 'Cora' and cv. 'Afrodite'.

Sugars in zucchini nectar

Our comparative analysis of sucrose concentration in nectar from the various cultivars (Tables 2a, 2b) revealed no significant differences for this trait based on

Table 2a. Results of the analysis of nectar sugar concentrations of four zucchini cultivars in relation to the time (hour) of sampling. Each time sample included the total samples collection in all cultivars.

Sugars	Time of sampling (x ± SE)
Sucrose (g l ⁻¹)	8 a.m.
	10 a.m.
Fructose (g l ⁻¹)	8 a.m.
	10 a.m.
Glucose (g l ⁻¹)	8 a.m.
	10 a.m.

Table 2b. Results of the analysis of nectar sugar concentrations of four zucchini cultivars, with all the data analysis pooled, in relation to the flower gender. Each gender included the total samples collection; it is not distinguished between cultivars and time of sampling.

Sugars	Flower gender (x ± SE)
Sucrose (g l ⁻¹)	Male
	Female
Fructose (g l ⁻¹)	Male
	Female
Glucose (g l ⁻¹)	Male
	Female

gender or hour of sample collecting during anthesis (N=60; P>0,05 in all cases).

Nectar from all cultivars had similar sucrose content, although some variation due to gender was evident (Table 2b). A similar result was noted for D-glucose and D-fructose.

An effect of the time during anthesis when nectar was collected from cv. 'Cora' (Fig. 2) was observed. Nectar sugar concentrations of this cultivar were highest at the beginning of anthesis and concentrations subsequently decreased rapidly (Fig. 2).

Data from cv. 'Cora' were used to assess the variation on sugar composition during the months of culture, as is shown in Fig. 3a and 3b. Effects of flower gender and season were observed for sucrose ($P_{\text{gender}} = 0,0011$; $P_{\text{months}} = 0,0027$) and fructose ($P_{\text{gender}} = 0,0284$; $P_{\text{months}} = 0,0283$), respectively, but only of flower gender for glucose ($P_{\text{gender}} = 0,0032$; $P_{\text{months}} = 0,0662$), and flower gender and season for fructose.

As shown in Table 3, analysis of sucrose/hexose ratios of cultivars and gender revealed an effect of cultivar on this characteristic. Comparison of means of this variable indicated that cv. 'Zuchino' (Table 3) had the highest sucrose/hexose ratio when compared to other cultivars, suggesting a genotypic effect.

Discussion

In a previous report (ROLDÁN-SERRANO et al. 2002), a statistically significant difference among the four cultivars, 'Afrodite', 'Elite', 'Cora' and 'Zuchino', in the number of visits of bumblebees per open flower was found being "Zuchino" the one with higher number of visits. Our study confirmed this result and revealed that this cultivar did not have any other better flower characteristic than a higher nectar volume and also a higher sucrose/hexoses ratio, as has been shown in the present work. This ratio is statistically significant different to the other cultivars and may evidence bumblebees choice.

Analysis of sugar concentrations in zucchini nectar revealed that sucrose was present in higher concentrations than either D-fructose or D-glucose. This is in agreement with the results obtained by NEPI and PACINI (1993) and NEPI et al. (2001). Our results indicate

Table 3. Sucrose/hexose ratios in nectar of four zucchini cultivars. Means followed by the same letter are not statistically different (95 %) according to the Fisher's test (LSD). N = 60.

Variety	Means of Ratio	ANOVA P-Value
'Elite'	1.901 a	0.0100
'Cora'	2.085 ab	
'Afrodite'	2.905 ab	
'Zuchino'	4.645 c	
<u>Flower Gender</u>		
Male	2.453 a	0.0949
Female	3.315 a	

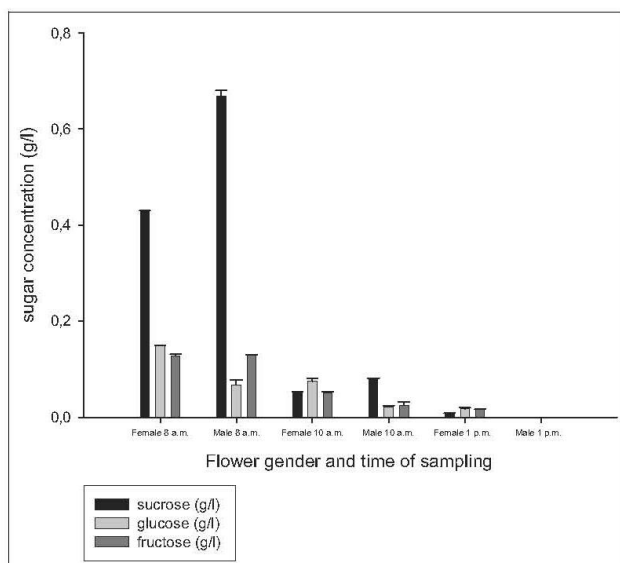


Fig. 2. Variation in nectar sugar composition of female and male flowers, respectively, of cultivar 'Cora' at three sample times during flower anthesis.

that there were differences between collecting times, but none of these were statistically different in the case of sugars. Nonetheless, variation in sugar concentrations between the months of culture have been found. Sugar concentrations in nectar decreased rapidly during anthesis. This is in agreement with the results published by NEPI et al. (1996), although their observations were based on a single cultivar. Our results using four cultivars appear to validate their results.

Our study indicated an effect of the genotype with regard to the frequency of visitation by bumblebees. A direct relationship between the number of bee visits per flower and the number of seeds set per fruit was also observed in this study. A previous study with watermelon (ADLERZ 1966) indicated that more than eight visits per flower were required in order to obtain complete fruit set. Our data suggests that two visits were required. These differences could be conferred to differences in the lengths of the period of anthesis of these two crop species.

Additional studies are required in order to identify other factors that govern the attractiveness of zucchini flowers to bumblebees, such as scent volatile compounds analysis, which are on their way (Mena Granero et al., in press). Some flower attributes such as colour, size, and the pattern of coloration may influence their behaviour (DAFNI 1992; FREE 1993). However, differences in corolla volume (an estimation of size) were not correlated with frequency of pollinator visits (ROLDÁN-SERRANO et al. 2002). Although we did not characterize the typical absorption spectrum for flowers in each cultivar, we found no visually detectable differences in corolla colour among the four cultivars examined. This suggests that differences in corolla colour cannot readily explain the differences in the relative attractiveness of flowers of these zucchini genotypes to bees.

Pollen and nectar are food rewards that supply the bumblebee's requirements for amino acids and carbo-

hydrates. Although some variation in zucchini cultivars in the amount of pollen has been observed previously (ROLDÁN-SERRANO et al. 2002), this variation cannot explain the observed variability in attractiveness to bumblebees.

Nectar is generally believed to be the most important factor attracting bees to flowers (DAFNI 1992; FREE 1993). Several studies have emphasized the importance of nectar volume or the importance of the concentrations of specific sugars (BAKER and BAKER 1983). The volume of nectar secreted by flowers of zucchini cultivars is very high (10–100 µl) and the effect of flower gender on nectar volume is an interesting characteristic of this species (NEPI et al. 1996; ROLDÁN-SERRANO et al. 2002). We previously found significant differences among genotypes (ROLDÁN-SERRANO et al. 2002) in the production of nectar from female flowers. Sugar concentration in total nectar did not differ among cultivars, although sugar composition was variable.

WALLER (1972) suggested that honey-bees prefer nectar with a sugar concentration in the range of 30 % to 50 % and that within this range there was no effect of variability in the individual concentrations of sucrose, glucose or fructose. SILVA and DEAN (2000) noted that the amount of *Allium* nectar was correlated with the number of bee visits. WOLF et al. (1999) also found a positive relationship between attractiveness of watermelon flowers to bees and nectar sugar concentration, suggesting that this characteristic is one of the parameters responsible for variability in attractiveness to honeybees. In the present study, cv. 'Zuchino' had the lowest concentrations of glucose and fructose and this contributed to its higher sucrose/hexose ratio. Thus, nectar sucrose/hexose ratios and volume may be responsible for the differences observed among flowers of zucchini cultivars in their attractiveness to bumblebees.

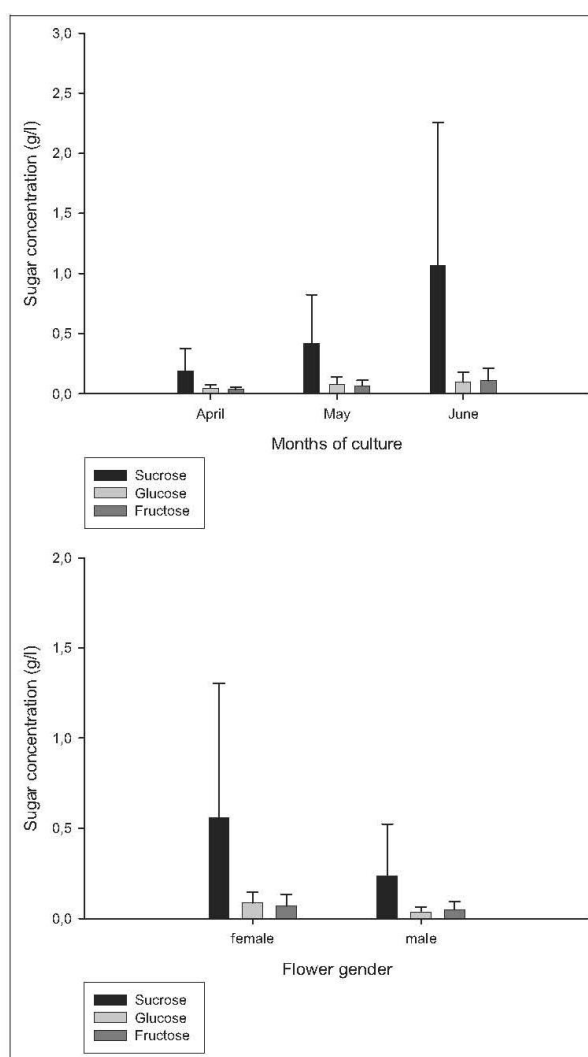


Fig. 3a and b. Means and standard errors of sugar concentration of nectar of cv. 'Cora' during three months of culture. (N = 30).

We have found little variability among the cultivars assayed regarding bumblebees quantitative rewards (pollen and nectar). Nevertheless, cultivar 'Zuchino' had a sucrose/hexose ratio higher than the other genotypes and also it was the most visited cultivar by bumblebees. In any case, the opportunity exists to select genotypes that secrete nectar with improved qualities to attract pollinators, ensuring pollination, and thus improving fruit quality.

Acknowledgements

Many thanks to Dr. Robert L. Jarret (USDA-GRIN), for his manuscript revision and comments.

References

- ADLERZ, W.C. 1966: Honey bee visits number and watermelon pollination. *J. Econ. Entomol.* **59**, 28–30.
- BAKER, H.G. and I. BAKER 1983: A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: JONES, C.E. and R.J. LITTLE (eds): *The biology of nectarines*. Columbia University Press, New York.
- BAKER, H.G. and I. BAKER 1990: The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel J. Bot.* **39**, 157–166.
- DAFNI, A. 1992: *Pollination ecology. A practical approach*. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- DOBSON, H.E.M., G. BERGSTRÖM and I. GROTH 1990: Differences in fragrance chemistry between flower

- parts of *Rosa rugosa* Thumb. (*Rosaceae*). Israel J. Bot. **39**, 143–156.
- FAHN, A. 1979: Secretory tissues in plants. Academic Press, London.
- FREE, J.B. 1993: Insect pollination of crops. 2nd. Ed. Academic Press, London.
- KROMBEIN, K.V., P.D. HURD, D.R. SMITH and B.D. BURKS 1979: Catalogue of Hymenoptera in America North of Mexico. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- LAMMERS, T.G. and C.E. FREEMAN 1986: Ornithophily among the Hawaiian Lobelioideae (*Campanulaceae*): evidence from floral nectar sugar composition. Amer. J. Bot. **73**, 1613–1619.
- MCGREGOR, S.E. 1976: Insect pollination of cultivated crops. U.S. Dept. Agr. Res. Serv., Agr. Hdbk. No. **196**.
- MENA GRANERO, A., J.M. GUERRA SANZ, F.J. EGEA and J.L. MARTINEZ VIDAL 2005: Zucchini flower nectar scent composition. J. Agric. Food Chem. (In press)
- NEPI, M. and E. PACINI 1993: Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. Annals Bot. **72**, 527–536.
- NEPI, M., E. PACINI and M.T.M. WILLEMSE 1996: Nectary biology of *Cucurbita pepo*: ecophysiological aspects. Acta Bot. Neerl. **45**, 41–54.
- NEPI, M., M. GUARNIERI and E. PACINI 2001: Nectar secretion, reabsorption, and sugar composition in male and female flowers of *Cucurbita pepo*. Int. J. Plant Sci. **162**, 353–358.
- ROBINSON, R.W. and S. REINERS 1999: Parthenocarpy in summer squash. HortScience **34**, 715–717.
- ROLDÁN-SERRANO, A.S., J.M. GUERRA-SANZ and M.J. ORTUÑO 2002: Flower attractiveness to Bumblebees (*Bombus terrestris* L.) in Zucchini (*Cucurbita pepo* L.). In: Proceedings *Cucurbitaceae* 2002. Naples, FL, USA, 343–348.
- RYLSKI, I. and B. ALONI 1991: Parthenocarpic fruit set and development in *Cucurbitaceae* and *Solanaceae* under protected cultivation in mild winter climate. Acta Hort. **287**, 117–126.
- SILVA, E.M. and B.B. DEAN 2000: Effect of nectar composition and nectar concentration on honey-bee (Hymenoptera: Apidae) visitations to hybrid onion flowers. J. Econ. Entomol. **93**, 1216–1221.
- WALLER, G.D. 1972: Evaluation responses of honey-bees to sugar solutions using an artificial flower feeder. Ann. Ent. Soc. Amer. **65**, 857–862.
- WOLF, S., Y. LENSKY and N. PALDI 1999: Genetic variability in flower attractiveness to honey-bees (*Apis mellifera*, L.) within the genus *Citrullus*. HortScience **34**, 860–863.

Received May 17, 2003 / Accepted January 31, 2005

Addresses of authors: Roldán-Serrano, A.S., Agrobío, S.L., Ctra. Nac. 340, Km. 419, El Viso 04745 La Mojonera, Almería, Spain and José Manuel Guerra-Sanz (corresponding author), CIFA La Mojonera, Paraje S. Nicolás, Autovía del Mediterráneo, Sal. 420, 04745 La Mojonera, Almería, Spain, e-mail: jmguerra@arrakis.es.

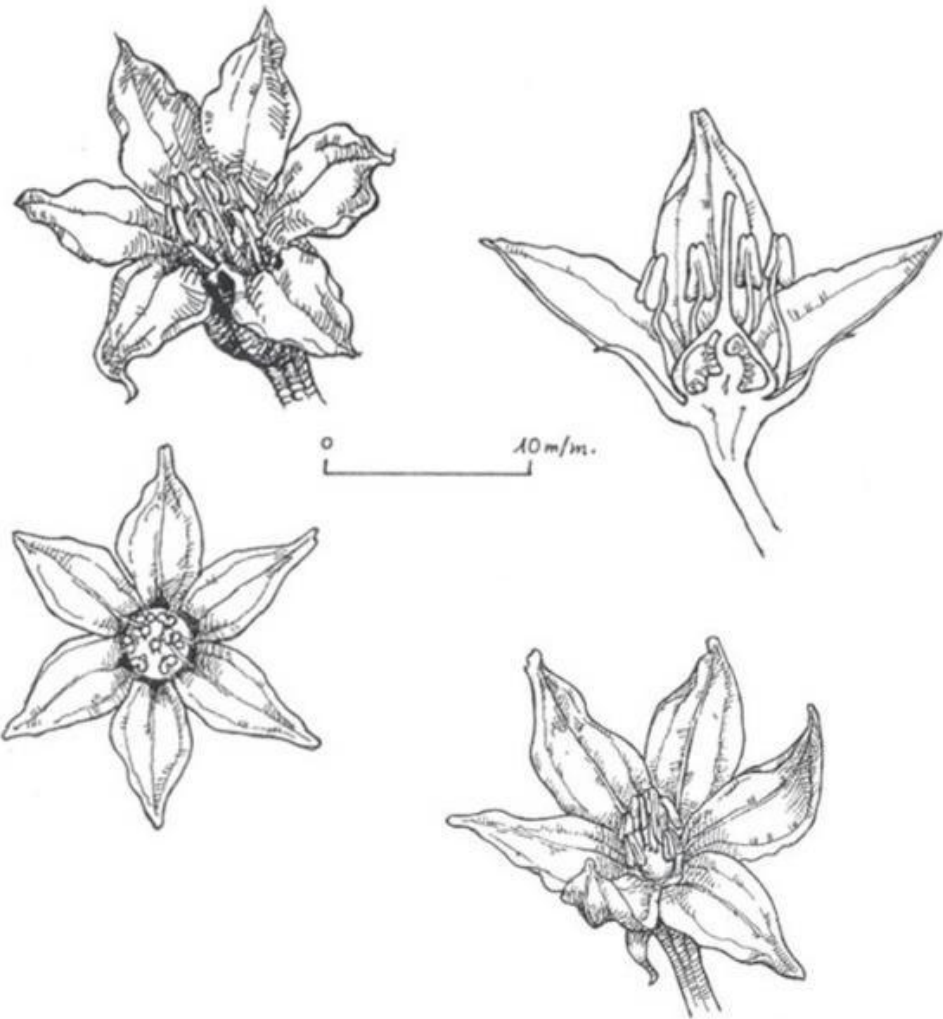
ARTÍCULO 2

“DYNAMICS AND SUGAR COMPOSITION OF SWEET PEPPER (*Capsicum annuum*, L.) NECTAR”

Autores:

Ana Roldán Serrano y José M. Guerra-Sanz

Artículo publicado en *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* (2004), 79 (5): 717-722. (Factor de impacto en JCR: 0,562)



Dynamics and sugar composition of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) nectar

By A. S. ROLDÁN-SERRANO¹ and J.M. GUERRA-SANZ^{2*}

¹AgroBío, S.L., Ctra. Nac. 340, Km.419, La Mojonera, Almería, Spain

²CIFA La Mojonera, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Aut. Del Mediterráneo, Sal. 420, Paraje San Nicolás, 04745 La Mojonera, Almería, Spain
(e-mail: jmguerra@arrakis.es)

(Accepted 18 April 2004)

SUMMARY

Nectar dynamics and sugar composition in several sweet pepper commercial cultivars of the “bell” type were studied during two years. Nectar volume per day was always small, depending on the cultivar and the time of collection, and never attained more than 10 µl per flower. Differences in nectar production and composition were found between cultivars and times of collection. One of the studied cultivars produced no nectar until the third month after blooming. Nectar volume decreased with flower age, being greater on the first day of floral anthesis, declining until the third day when it almost disappeared. Nectar from all cultivars was hexose-dominated (glucose and fructose), although sucrose was identified in most samples. The sucrose to hexoses ratio was very variable, not only between cultivars, but also within the same cultivar. That ratio varied among samples of the same cultivars, depending on the time of collection. The importance of nectar volume and sugar composition in sweet pepper is discussed from the point of view of pollinators’ commercial application.

Three species belonging to the *Solanaceae* are cropped as extra-early horticulture plants: pepper, tomato and aubergine. Pepper (*Capsicum annuum*, L.), is the only species, of these three, which produces nectar. The other two species, tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) and aubergine (*Solanum melongena*, L.), have nectarless flowers. Pollination by insects, especially by members of the family *Apidae* (honeybees and bumblebees), has become a very powerful tool to increase production and quality yields in species like tomato and pepper (Shipp *et al.*, 1994; Morandin *et al.*, 2001a). Presence of nectar in flowers is the main attraction for pollinators like honeybees (*Apis mellifera*, L.) or bumblebees (*Bombus terrestris*, L.) although they are nectar and pollen eaters. This allows visits to flowers which, at the same time, permit an extra load of pollen to be deposited on the flower stigma, making fertilization easier and promoting a maximum set of fruit.

Pollination of tomato and pepper by bumblebees has been studied (Shipp *et al.*, 1994; Morandin *et al.*, 2001a, 2001b). However, it is surprising that few studies on pepper nectar have been published, despite the relevance of the subject. Martin *et al.*, (1932) indicated the presence of glucose only, while sucrose was not tested; Rabinowitch *et al.* (1993) found that pepper nectar contained fructose and glucose only, whereas Roldán-Serrano *et al.* (2002), using an analysis technique different from the former authors, found fructose, glucose and sucrose.

Nectar is more than a mixture of sugars in solution. Sugars, their concentrations and their relative amounts seem all important for pollination, pollinators and plant systematics (Kevan, 2003). The sucrose to hexoses ratio (sucrose: [glucose + fructose]), the most commonly

found sugars in nectars, has become a standard measure for describing nectars and inferring aspects of pollination biology (Baker and Baker, 1983).

Production and composition of nectar vary widely according to species (Fahn, 1979; Baker and Baker, 1983) environmental (Fahn, 1979; Cruden *et al.*, 1983; Marden 1984; Freeman and Head, 1990; Wyatt *et al.*, 1992) and physiological factors (Gottsberger *et al.*, 1990; Petanidou *et al.*, 1996).

The significance of temporal and geographical changes in nectar characteristics (volume and sugar composition) has rarely been studied. The consequences of these variations are relatively poorly understood (Lanza *et al.*, 1995). A study on nectar dynamics and sugar composition of sweet pepper was made as part of a wider research project on the use of pollinators for enhancement of sweet pepper commercial production, under plastic greenhouse conditions, in the South of Spain.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out over two years:

2002 experiments

Seven pepper cultivars, namely Bardenas, Vergasa and Roxy (Syngenta Seeds Inc., Vicar, Spain), Yolo Wonder (Semini Seeds Inc., Roquetas de Mar, Spain), Chotis (Rijz Zwaan Seeds, Almería, Spain), Padron and Jindungo, were transplanted at the beginning of March and they started to flower from May onward. The first five genotypes belong to the sweet pepper “bell” type and are current commercial varieties, ‘Yolo Wonder’ is an old variety. Padron is a Spanish landrace middle hot type and Jindungo is an African landrace very hot type. The experimental design was three replicates per cultivar, with six plants per replicate along two beds. Plants were

*Author for correspondence.

TABLE I

Means and standard deviations of accumulated volume of nectar produced per day (2002 experiment). Nectar from five flowers per variety was collected to make the ANOVA. This analysis showed no significant difference between cultivars although some produce more nectar than others. Jindungo is not included because it did not produce any nectar

Pepper cultivar	Means and SD
Bardenas	0.72 ± 0.072
Vergasa	0.78 ± 0.027
Yolo Wonder	2.14 ± 8.623
Padron	0.18 ± 0.072
Chotis	0.96 ± 1.433
Roxy	0.16 ± 0.128

grown in a polycarbonate greenhouse, with nets on the ventilation windows. These plants, grown in perlite pots, were nourished and watered by drip irrigation with an optimized mineral solution.

At least five nectar samples were collected from each genotype at three times (0830, 1030 and 1230 hours), its volume measured and, finally, kept frozen for further analysis. Nectar sugar composition was analysed enzymatically using Sucrose/D-Glucose/D-Fructose kit (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany).

2003 experiments

Two experiments were carried out in this year. One was a repetition of the former experiment of 2002 but with only three of the cultivars, Roxy, Bardenas and Vergasa (Syngenta Seeds Inc., Vicar, Spain). They were grown in an acclimatized greenhouse which allowed the stability of temperature through spring-summer time. Nectar volume collection was performed as in the 2002 experiment, but the number of varieties permitted several studies on the effect of sampling time in relation to flower age, as described in Results.

Apart from this experiment, nectar was collected from several commercial varieties of bell peppers from a research greenhouse in Torrepacheco, Murcia, belonging to Syngenta Seeds, three times during February, March and April. The cultivars sampled were Almuden, Alcantara, Sprinter, Quito, Trebol, Requena and Cabezo, all of them from Syngenta Seeds, except 'Sprinter' (Seminis Seeds, Roquetas de Mar, Almería, Spain), and belonging to the "bell" pepper type. The plants were grown in soil and the greenhouse was equipped with heating. The time of collection was always the same and we collected nectar from at least ten flowers per genotype per visit. The volume was measured as before. Each sample was maintained at 4°C until the arrival at the laboratory and then kept frozen at -20°C.

Sugar analysis of samples in 2003 was carried out as follows: An aliquot of each sample was diluted in MilliQ grade water and subjected to Liquid Chromatography in a SugarPack1 column using a Waters HPLC system (Waters 1515 Isocratic HPLC Pump) equipped with a Waters Refractive Index Detector 2414 according to the following conditions: 0.5 ml min⁻¹ flow, H₂O mobile phase, 90°C column temperature and 30°C detector temperature. The sugars were identified by their retention times in comparison with pure chemicals purchased from Sigma, Fluka or Supelco. Sugar quantification was carried out by injection of known concentrations of standards of pure chemicals using the Breeze software provided by the Waters system.

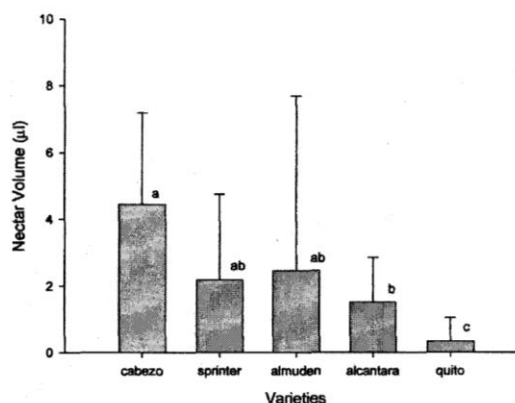


Fig. 1

Means and SEs of nectar volume of five cultivars from Torrepacheco greenhouse, 2003 experiment. The figure shows the means comparison of nectar volume per flower of five pepper cultivars according to the ANOVA results and LSD comparison of means. Means with the same letter indicate that they are not different at 95% level of confidence according to LSD test.

Pollen viability was assessed by the FDA staining technique (Heslop-Harrison *et al.*, 1984). Stigma receptivity was evaluated by a semi-quantitative approach, according to Dafni and Motte-Maués (1998).

Statistical analysis

ANOVA tests and comparison of means was performed when appropriated, using the Statgraphic plus 4.0 software.

RESULTS

The means and standards deviations of accumulated nectar volume per day of the seven varieties studied in 2002 are shown in Table I. ANOVA of these data showed no statistically significant difference between the accumulated mean volume from one cultivar to another at the 95% confidence level ($P=0.2217$; $N=30$). 'Jindungo' produced no nectar during the culture. The highest volume was attained by 'Yolo Wonder' followed by the 'Chotis' and 'Vergasa'.

Sugars encountered in those cultivars were sucrose, glucose and fructose, but the relative amount of each sugar in each cultivar was variable. The average concentration of four cultivars (Bardenas, Vergasa, Yolo Wonder and Padron) with enough volume to be processed was (minimum volume 1 µl), 125.6 g l⁻¹ of sucrose, 132.4 g l⁻¹ of glucose and 151.5 g l⁻¹ of fructose. This sugar analysis detected not only D-glucose and D-fructose, but also sucrose. It was not possible to carry out comparison of cultivars because of the low volumes produced.

2003 experiments:

Torrepacheco sampling

Two cultivars, Requena and Trebol, which were sampled together with the other five (Almuden, Alcantara, Sprinter, Quito and Cabezo), produced nectar volumes below the level of detection during that period and, therefore, these cultivars are not included in the

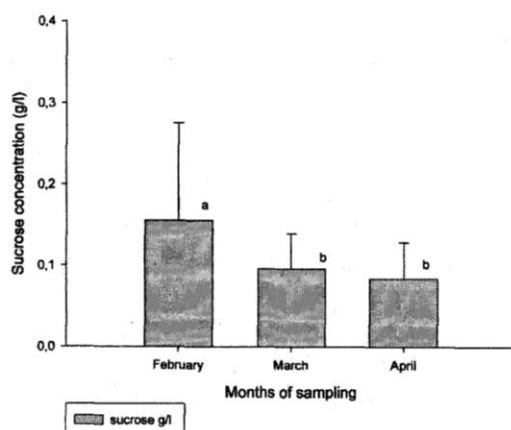


Fig. 2
Means and SEs of sucrose amounts in nectar samples during three months of culture of the experiment of Torrepacheco (Murcia).

analysis. The means and standard errors of nectar volume of the five pepper cultivars for the three months of culture are displayed in Figure 1.

Thirty samples per variety were analysed by ANOVA. There was significant effect of cultivar on nectar volume (P -value=0.0000; N =148) but not on the date of collection (P -value=0.2414; N =148).

Sugar composition analyses of the samples obtained from the Torrepacheco (Murcia) greenhouse were measured as sugar concentration (g l^{-1}) after HPLC analysis, except for 'Quito', which had insufficient volume to be processed. An analysis of variance was carried out with the varieties and dates of collection as the factors on the dependent variable. Both factors had statistically significant effect on sugars composition ($P_{\text{varieties}}=0.0000$; $P_{\text{dates}}=0.0000$; N =40).

Sugar analysis of these pepper samples indicated that the major sugars encountered were sucrose, glucose and fructose, but traces of raffinose were also found in some

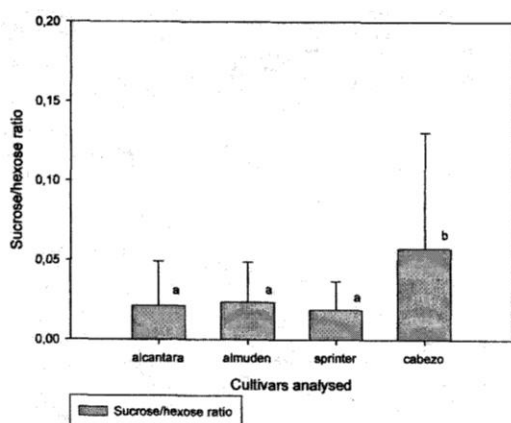


Fig. 3
Sugar ratio means and standard deviations of each variety analysed in the Torrepacheco (Murcia) experiment.

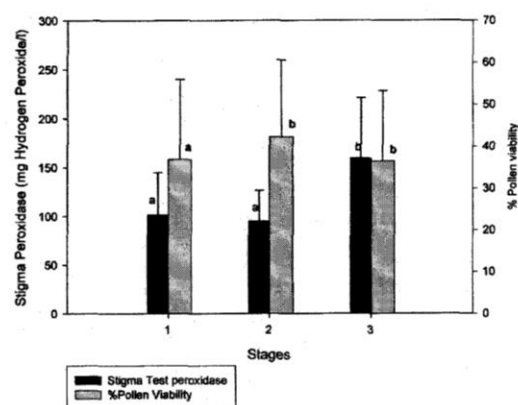


Fig. 4
Stigma receptivity and pollen viability according to flower developmental stages from cultivars of the acclimatized greenhouse experiment of 2003, namely, Bardenas, Vergasa and Roxy.

samples (data not shown). Figure 2 shows the effect of sampling date on sucrose concentration; sucrose concentration was higher in February than in the other two months of sampling.

The other sugars encountered in nectar were glucose and fructose. We present these data of the whole nectar samples as the ratio of the sugars (Sucrose/[Glucose + Fructose]). These results are summarized in Figure 3. 'Cabezo' had the highest ratio, which means that it contained more sucrose than the other cultivars, followed by 'Almuden'. 'Cabezo' was statistically significant different from 'Alcantara', 'Almuden' and 'Sprinter' by LSD test at 95% level of confidence.

Acclimatized greenhouse sampling

'Bardenas', 'Vergasa' and 'Roxy' were grown in the acclimatized greenhouse experiment. In this experiment the maximum corolla diameter of each open flower sampled for nectar volume was measured and recorded over three months. An analysis of the distribution frequency of opening diameter per variety was performed to divide the development of the flowers into three discrete stages, according to the percentiles of each variety. These percentile values were similar except for 'Roxy', which had a wider habit of corolla opening (Table II). Each variety had its class marks to identify their stages of development, as it is outlined in Table II.

Pollen viability and stigma receptivity data collected over the three months of experimental culture are presented by the means and standard errors per stage of flower development of the three varieties together (Figure 4). ANOVA results of each factor separately indicated a statistically significant effect of stage

TABLE II
Class marks of quartiles frequencies in corolla widths per variety. Data from 2003 in acclimatized greenhouse experiment

Cultivars	Range of open corolla diameters (cm)		
	Stage 1	Stage 2	Stage 3
Bardenas	0–1.0	1.01–2.0	2.01–3.0
Vergasa	0–1.0	1.01–2.0	2.01–3.0
Roxy	1.0–1.5	1.5–2.0	2.01–3.0

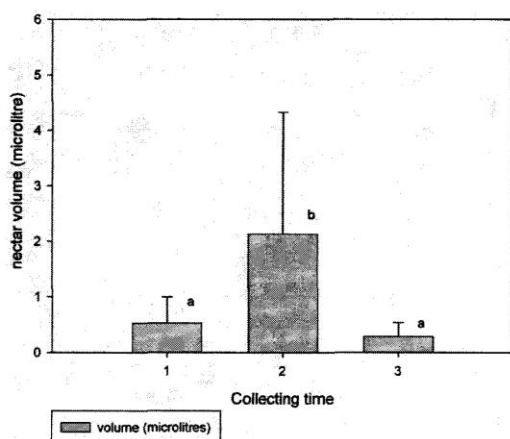


Fig. 5

Means and standard errors of each collecting time of nectar volume. ANOVA results showed that collecting times had a significant effect on volume collected.

development on pollen viability ($P_{\text{pollen viability}}=0.0011$; $N=27$; $P_{\text{stigma peroxidase}}=0.0130$; $N=34$). Means comparison by LSD test showed that stage 1 was statistically significant different from stages 2 and 3 in pollen viability, whereas in stigma peroxidase level, stages 1 and 2 were statistically different from stage 3. Nectar volume of the three varieties used in this experiment varied according to the time of collection as indicated in the Figure 5.

ANOVA results of the three months collections of volume did not indicate statistically significant effect of cultivars on volume, but depended on the time of collection and stage of development. Nectar volume varied depending on the anthesis development stage of the flowers. In the cultivars studied, flower anthesis lasted 3 d on average. When nectar volume per stage is compared, ANOVA pointed out a statistically significant effect on volume, Figure 6.

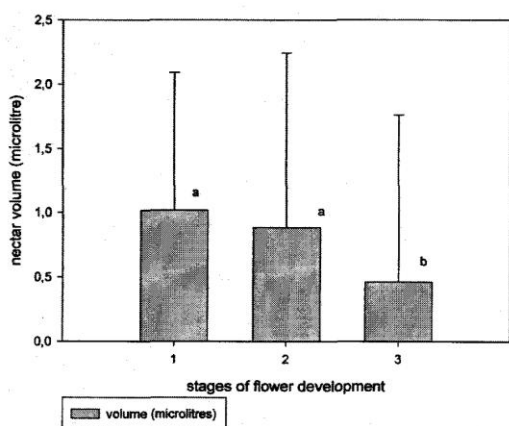


Fig. 6

Means and standard errors of nectar volume of each flower developmental stage. Flower development stage had a significant effect on volume collected.

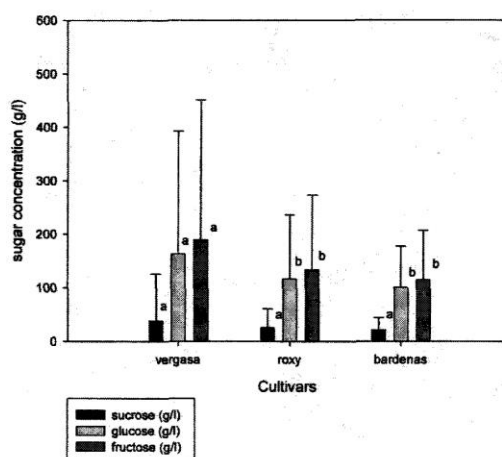


Fig. 7

Sucrose, glucose and fructose concentrations of nectar samples in three cultivars.

Main sugars found in these samples were always sucrose, glucose and fructose, although traces of raffinose were also encountered in some samples (data not shown). Sugar concentration per variety during the months of culture is displayed in Figure 7.

Collecting time had significant statistical effects with respect to sugar ratio. The comparison of means by LSD at 95%, gave that collecting times 1 and 2 were statistically different from 3, Figure 8. Sugar concentrations showed variation depending on stage of development of the flower, according to Table III, which shows sucrose concentrations and sugar ratios for each developmental stage of flowering.

DISCUSSION

In most "bell" pepper varieties studied and in some others such as 'Padron', nectar was present during flower

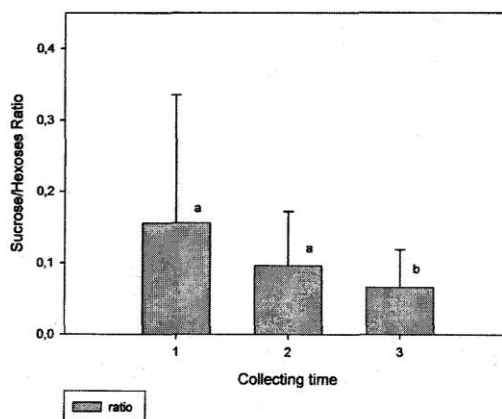


Fig. 8

Sugar ratio means and SEs for three collecting times.

TABLE III

Means and standard deviations of nectar sucrose concentration along the developmental stages of flower from the experiment of the acclimatized greenhouse of 2003. ANOVA results had a P-value= 0.0000; N=84. Means followed of the same letter indicates statistical differences at the 95% level of confidence according to the LSD test

Developmental stages	Sucrose means	Sucrose SD	Ratio means	Ratio SD
1	102.58 a	± 145.29	0.167 a	± 0.166
2	8.96 b	± 13.06	0.057 b	± 0.073
3	0.02 b	± 0.0	0.002 b	± 0.001

anthesis although in 'Quito' in the Torrepacheco (Murcia) experiment, no nectar was obtained until the third month of flowering. According to Fahn (2000), the origin of secreted nectar is the phloem sap. This means that individual and seasonal variations can be expected, especially in plants that bloom over long periods. It is the case with sweet pepper, which flowers for approximately three months.

Nectar and pollen in flowers make pollination by honeybees and bumblebees more feasible. Differences in pollination between having nectar and nectarless flowers of the same species have not been compared so far, but, in principle, the existence of the two pollinator rewards (nectar and pollen) together in the same flower should encourage pollination by honeybees and bumblebees.

Nectar amount was very variable depending on the development stage of the flower, time of collection and variety, in agreement with the photosynthetic origin of the nectar, which at least partially, mirrors different photosynthetic activities of the plant or of various parts of a plant, as in the case of sweet pepper. The nectar volume dynamics was related to ageing of the flower and the time of the day. Maximum volume was encountered on the first day of anthesis and during the second time of collection, which could be related to photosynthate accumulation because little nectar was detected at the first hour of the morning. Thus, it can be deduced that nectar production occurred during daytime. The basal part of the nectary parenchyma contains chlorophyll (Rabinowitch *et al.*, 1993), the nectary may produce the sugar components of the nectar directly by photosynthesis and starch storage may not be necessary. In other species with greater nectar production, starch or other polysaccharide, is generally stored in the nectary parenchyma and the sugar component of the nectar is derived from photosynthate from other flower or plant parts (Nepi *et al.*, 2003).

Great differences have been found in nectar volume per flower between the results of Rabinowitch *et al.*, (1993) and ours. This could be attributed to the different genotypes studied in each case.

The presence of sucrose has been detected in almost every sample analysed, both in the experiments of 2002 as

in those of 2003, despite differences in the analysis technique during the two years. The major sugars were glucose and fructose, having almost always sucrose as the lowest amount of the three main sugars. To our knowledge, this is the first report of sucrose in sweet pepper nectar. The above results are in accordance with the observations of Percival (1961), who argued that fructose and glucose-dominated nectars appeared to be associated with "open" flowers having unprotected nectars. A similar case of hexose-dominated nectar has been described for oilseed rape (*Brassica napus*) (Pierre *et al.*, 1999).

The cultivar effect has been observed in nectar volume per flower, in glucose and fructose concentrations and, consequently, in the sugar ratio. Sugar ratios were very variable between seasons and time of collection, in agreement with previous reports (Pierre *et al.*, 1999; Nepi *et al.*, 2003).

There was no good correlation between corolla width and nectar production in our study (data not shown), although this trait has been used in other species to estimate nectar productivity (Wolf *et al.*, 1999). Timing of nectar secretion seems more related with flower ageing, taking into account that the developmental stages of pepper flowers follow a simple scheme: At flower anthesis (first stage), both stigma receptivity and pollen viability are optimal then diminish until the third day when stigma receptivity is almost nil and pollen viability has decreased substantially. However, stigma receptivity by the peroxidase test did not appear in our study to be a good indicator, because in some trials with emasculated stage 3 flowers (data not shown), seed set did occur, which is a proof of stigma receptivity. Apparently, a certain degree of dichogamy occurred in sweet pepper, because pollen viability decreased significantly by stage 3, whereas the stigma was still receptive.

The great variations in nectar volume and its seasonality might account for variability in sweet pepper pollination by honeybees or bumblebees, although this should be examined with caution, because foraging behaviour is still highly unpredictable, due to other lures and clues used by each pollinator species (Goulson, 2003). In any case, we have found nectar in most of the bell pepper commercial genotypes studied, as reported by Rabinowitch *et al.*, (1993), and thus, the opportunity exists to select genotypes that secrete sufficient amounts of nectar to attract pollinators, ensuring pollination, and thus improving fruit quality, as described by Shipp *et al.*, (1994).

Further research is needed, taking into account all these environmental variables which seem to have influence on nectar availability for pollinators in sweet peppers.

We thank AgroBío, S.L. for their support of the research and Syngenta Seeds for permission to sample their pepper varieties in Torrepacheco greenhouse.

REFERENCES

- BAKER, H. G. and BAKER, I. (1983). A brief historical review of the chemistry of floral nectars. In: *The biology of the nectaries*. (Bentley B. and Elias T., Eds). Columbia University Press, New York, USA, 126–52.
- CRUDEN, R. W., HERMANN, S. M. and PETERSON, S. (1983). Patterns of nectar production and plant animal coevolution. In: *The biology of nectaries*. (Bentley B. and Elias T., Eds). Columbia University Press, New York, USA, 80–125.
- DAFNI, A. and MOTTE-MAUÉS, M. (1998). A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sexual Plant Reproduction*, **11**, 177–80.
- FAHN, A. (1979). *Secretory tissues in plants*. Academic Press. London, UK.
- FAHN, A. (2000). Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*, **31**, 37–75.

- FREEMAN, C. E. and HEAD, K. C. (1990). Temperature and sucrose composition of floral nectars in *Ipomopsis longiflora* under field conditions. *Southwestern Naturalist*, **35**, 423–6.
- GOULSON, D. (2003) *Bumblebees: their behaviour and ecology*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- GOTTSBERGER, G., ARNOLD, T. and LINSKENS, H. F. (1990). Variation in floral nectar amino acids with ageing of flowers, pollen contamination, and flower damage. *Israel Journal of Botany*, **39**, 167–176.
- HESLOP-HARRISON, J. S., HESLOP-HARRISON, Y. and SHIVANA, K. R. (1984). The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical Applied Genetics*, **67**, 367–75.
- KEVAN, P. G. (2003). The modern science of ambrosiology: in honour of Herbert and Irene Baker. *Plant Systematic and Evolution*, **238**, 1–5.
- LANZA, J., SMITH, G. C., SACK, S. and CASH, A. (1995). Variation in nectar volume and composition of *Impatiens capensis* at the individual, plant, and population levels. *Oecologia*, **102**, 113–9.
- MARDEN, J. H. (1984). Intrapopulation variation in nectar secretion in *Impatiens capensis*. *Oecologia*, **63**, 415–22.
- MARTIN, J. A., ERWIN, A. T. and LOUNSBERRY, C. C. (1932). Nectaries of *Capsicum*. *Iowa State College, Journal of Science*, **6**, 277–85.
- MORANDIN, L. A., LAVERTY, T. M. and KEVAN, P. G. (2001a). Effect of bumble bee (Hymenoptera: Apidae) pollination intensity on the quality of greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 172–9.
- MORANDIN, L. A., LAVERTY, T. M. and KEVAN, P. G. (2001b). Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and pollination levels in commercial tomato greenhouses. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 462–7.
- NEPI, M., PACINI, E., NENCINI, C., COLLAVOLI, E. and FRANCHI, G. G. (2003). Variability of nectar production and composition in *Linaria vulgaris* (L.) Mill. (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **238**, 109–18.
- PERCIVAL, M. (1961). Types of nectar in Angiosperms. *New Phytologist*, **60**, 235–81.
- PETADINO, T., VAN LAERE, A. J. and SMETS, E. (1996). Change in floral nectar components from fresh to senescent flowers of *Capparis spinosa* (Capparidaceae), a nocturnally flowering mediterranean shrub. *Plant Systematics and Evolution*, **199**, 79–92.
- PIERRE, J., MESQUIDA, J., MARILLEAU, R., PHAM-DELEGUE, M. H. and RENARD, M. (1999). Nectar secretion in winter oilseed rape, *Brassica napus*—quantitative and qualitative variability among 71 genotypes. *Plant Breeding*, **118**, 471–6.
- RABINOWITZ, H. D., FAHN, A., MEIR, T. and LENSKY, Y. (1993). Flower and nectar attributes of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants in relation to their attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Annals Applied Biology*, **123**, 221–32.
- ROLDÁN-SERRANO, A. S., ORTUÑO-IZQUIERDO, M. J. and GUERRA-SANZ, J. M. (2002). Pollination of *Capsicum annuum* (L.) (sweet pepper) flowers by bumble-bee visits during autumn-winter crop under greenhouse conditions. *Gordon Research Conference: "Floral Scent, Biology, Chemistry and Evolution of"* Ventura, Los Angeles, California, USA. 4.
- SHIPP, J. L., WHITFIELD, G. H. and PAPADOPOULOS, A. P. (1994). Effectiveness of the bumble bee, *Bombus impatiens* Cr. (Hymenoptera: Apidae), as a pollinator of greenhouse sweet pepper. *Scientia Horticulturae*, **57**, 29–39.
- WYATT, R., BROYLES, S. B. and DERDA, G. S. (1992). Environmental influences on nectar production in milkweeds (*Asclepias siliqua* and *A. exaltata*). *American Journal of Botany*, **79**, 636–42.
- WOLF, S., LENSKY, Y. and PALDI, N. (1999). Genetic variability in flower attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.) within the genus *Citrullus*. *HortScience*, **34**, 860–3.

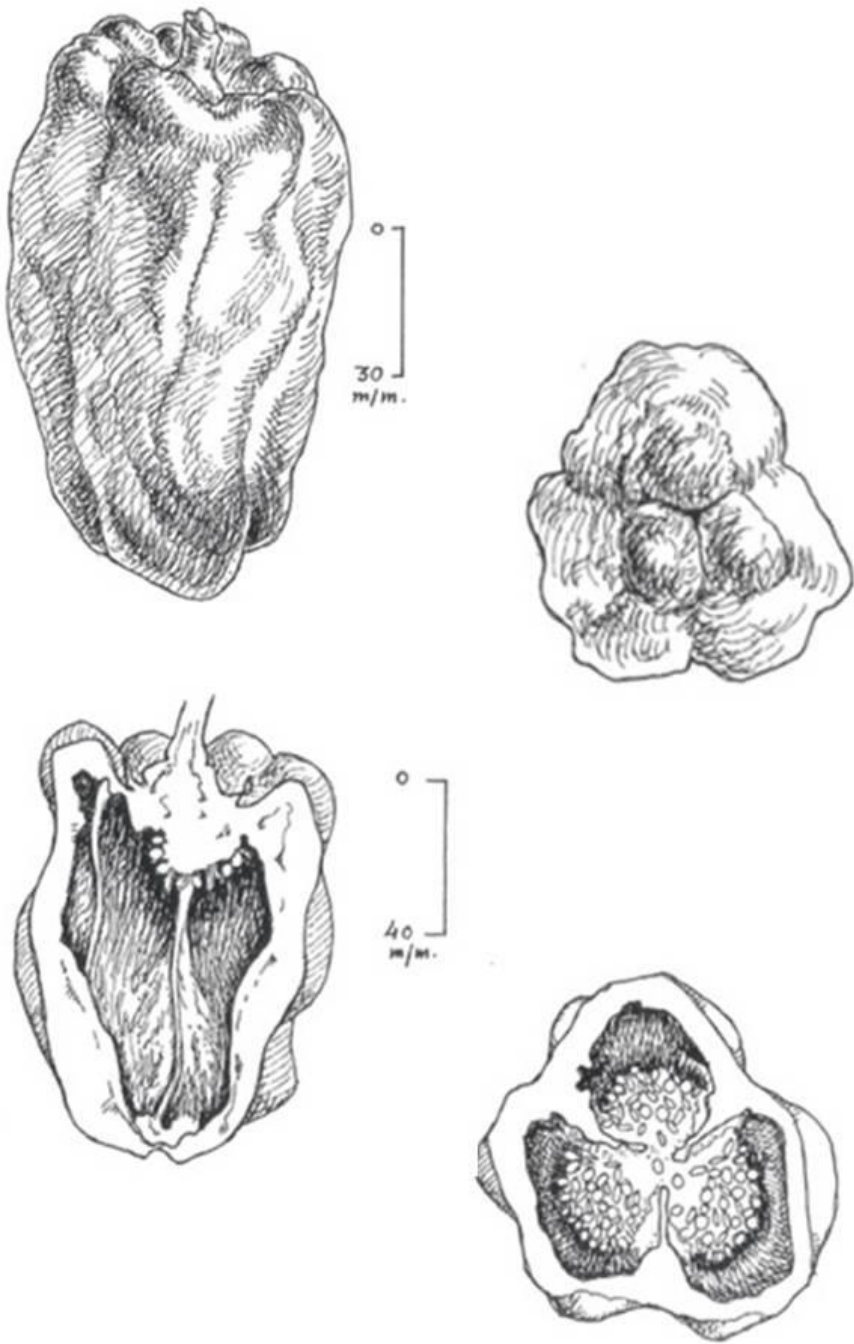
ARTÍCULO 3

“QUALITY FRUIT IMPROVEMENT IN SWEET PEPPER CULTURE BY BUMBLEBEE POLLINATION”

Autores:

Ana Roldán Serrano y José M. Guerra-Sanz

**Artículo publicado en *Scientia Horticulturae*, 110 (2006): 160-166.
(Factor de impacto en *JCR*: 1,4)**





Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination

Ana Roldán Serrano^b, José M. Guerra-Sanz^{a,*}

^a CIFA La Mojonera, I.F.A.P.A., Consejería de Ciencia, Innovación y Empresa, Junta de Andalucía, Autovía del Mediterráneo, Sal. 420, 04745 La Mojonera, Almería, Spain

^b Agrobio, S.L., Ctra. Nacional 340, Km. 419, El Viso, 04745 La Mojonera, Almería, Spain

Received 1 August 2005; received in revised form 16 May 2006; accepted 28 June 2006

Abstract

The percentage of ovules that set seeds per fruit has been used to evaluate the bumblebee activity of a two campaigns greenhouse trial. The experiment was carried out with two commercial cultivars of sweet pepper, 'bell' type, called Bardenas and Vergasa. The averages of the percentages of seed set per fruit of the two campaigns were 49.8% (Bardenas) and 40.7% (Vergasa) on the pollination treatment, whereas the averages of the control (self-pollination) treatment were 27.5% and 25.7%, respectively. Percentages of seed set per fruit was strongly related with the number of bee visits, but weakly with duration of visits.

The number of pollen grains deposited on stigmas by pollinators or by self-pollination was assessed by staining and microscopy, resulting in a higher number of pollen grains on the bumblebees-pollinated flowers than on the control (self-pollination) ones. As a consequence of this, the number of seeds set on the bumblebees-pollinated fruits, was always higher than in the control.

Flowers visited by bumblebees produced larger and heavier fruits than non-visited flowers. Because fruit external maximum diameter, length and weight were highly dependent on seed set, the use of pollinators seems to be required to obtain sweet pepper fruits with improved quality characteristics. Percentage of seed set per fruit was correlated with the number of bumblebee visits to the flowers, seeds per fruit, number of pollen grains on stigma, and the quality fruit traits. The number of pollen grains per stigma was correlated with the number of seeds per fruit.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Capsicum annuum* (L.); *Bombus terrestris* (L.); Sweet pepper; Pollination; Percentage of seed set per fruit; Quality yield; Correlations

1. Introduction

It has been demonstrated that the weight and size of fruit and the number of seeds they contain are directly proportional to pollen load in various species (Mann, 1943; Visser and Verhaegh, 1987; Winsor et al., 1987). This is especially important for cultivated plants, where pollination is usually a critical step in crop production. Fruit and seed set are especially dependent on successful pollination when the species under consideration cannot be selfed. However, even in some examples of self-pollinated flowers, as in pepper (*Capsicum annuum*, L.), insect pollination has been considered to improve fruit quality and thus to increase the incomes of the farmers (Abak et al., 1997).

It has been subjected to controversy if pepper was a cross-pollinating plant or not, because the flowers have nectar, which is a floral trait usually linked to pollination (Rabinowitch et al., 1993; Roldán Serrano and Guerra Sanz, 2004), and a little

difference between the onset of anthers and carpels exists (McGregor, 1976; Pickersgill, 1997; Roldán Serrano and Guerra Sanz, 2004). All these details taken altogether have made that sweet pepper not be considered a 100% self-pollinated plant (McGregor, 1976; Pickersgill, 1997). Regarding the so-called 'pollination syndrome' (Percival, 1961; Baker and Baker, 1982, 1990), pepper flowers go into the group of the open flowers, with hexose (glucose and fructose) rich nectar (Rabinowitch et al., 1993; Roldán Serrano and Guerra Sanz, 2004), although sucrose has also been found (Roldán Serrano and Guerra Sanz, 2004).

The scientific literature on pepper pollination is scarce. Thus, we have found a few studies of pollination of greenhouse sweet pepper with different pollinators, such as the solitary bees, *Osmia cornifrons* (Radoszkowski), bumblebees, *M. rotundata* or the honey bee, *Apis mellifera* and all these works have found that insect pollination increased fruit weight and the percentage of extra-large and large fruit compared with self-pollinated fruit (Kristjansson and Rasmussen, 1991; de Ruijter et al., 1991; Abak et al., 1997; Kubisova and Haslbachova, 1991; Dag and Kammer, 2001; Meisels and Chiasson, 1997). Shipp et al. (1994) studied

* Corresponding author. Tel.: +34 950558030; fax: +34 950558055.
E-mail address: jmguearra@arrakis.es (J.M. Guerra-Sanz).

the effect on sweet pepper yield of bumblebee (*Bombus impatiens*, Cresson) pollination, but the researchers did not take into account the degree of pollen deposition on stigma. Jarlan et al. (1998), working with *Eristalis tenax*, showed the effect of pollination by this insect on the number of seeds produced. Most of these works did not studied the effect of the pollinators on the deposition of pollen grains on the stigmas, something that is needed to assess the performance of the pollinators on the fruit formation (Morandin et al., 2001c).

The level of bumble bee (*Bombus terrestris*, L.) activity on many crops is difficult to evaluate because there is not any signal of foraging left behind on the flowers, except in the cases of tomato and aubergine, where pollination by bumblebees causes bruising or necrotic spotting on the anther cone (Morandin et al., 2001a,b,c; Guerra Sanz et al., 2005). The use of bumblebees as pollinators in other crops, different from tomatoes or aubergines, encourages the need of finding techniques of accurate measurement of their activity.

The objectives of the present study were to determine the number of pollen grains deposited on the stigmas after pollinator visit, to assess the percentages of seed set per fruit and pepper quality production in the presence and absence of bumblebees; to estimate the number of visits by bees required to induce fruiting and to establish the effect of the number and cumulative duration of the bee visits on the percentage of seed set per fruit as well as on the quality of fruits.

2. Material and method

2.1. Plant material

Two sweet pepper commercial cultivars have been used, namely, Bárdenas and Vergasa (Syngenta Seeds, Vicar, Almería, Spain). Both cultivars belong to the 'bell' type cultivars and produce nectar and pollen in their hermaphrodite flowers (Roldán Serrano and Guerra Sanz, 2004).

Plant culture was carried out in a greenhouse, made on polyethylene film (Triplecoat type, Macresur, La Mojonera, Almería, Spain), of 1000 m² of cultivable surface. Plant transplantation to perlite sacs was made in the middle of July 2002 and 2003, respectively, at a density of 3 plants/m², and the cultures were maintained until the month of March of the following year. Plants were watered and fed by drip irrigation over demand.

2.2. Pollination treatments

One pollination treatment, and its control, was established by a curtain made on anti-thrips net set in the middle of the greenhouse with north to south orientation, whereas the main axis of the greenhouse was east to west, thus making two 'halves' of the entire greenhouse.

2.3. Bumblebees' activity and remote monitoring

Two commercial bumblebees hives of *B. terrestris* (L.) (Agrobío, S.L., La Mojonera, Almería, Spain) were introduced

at the beginning of the blooming season, each one with a queen and 50–80 workers. A remote monitoring system was installed inside the greenhouse, which consisted of two network cameras Axis 2130R, linked to a data switch and by a remote wireless access point Intel Wireless Gateway to a PC in the laboratory. These cameras were located as follows: one, at 10 m of distance in front of the hives, the other one was used in other experiments related to bumblebee visits. Their signals were transmitted to the computer in the laboratory and watched or recorded according to our needs. After opening the hives, one observer was counting the number of trips to and from the hives every 15 min from the computer screen, which was showing the view of the hives through the web cameras system. At the same time, another observer was counting the number of visits made by the bumblebees to the pepper flowers.

2.4. Bumblebees visits to flowers

Monitoring of the bumblebee visits to flower was carried out by labelling visited flowers and keeping record of them by visual observation on the number and duration of the visits. More than 30 flowers per treatment of the bumblebee visited and control plots were detached immediately after a certain number of pollinator visits, their anthers were excised and kept between humid paper pads to avoid desiccation and pollen removal from the stigmas and brought to the laboratory, where they were stained for counting the number of pollen grains adhered to the stigma. Pollen grains adhered to the stigma were assessed by staining with Methyl-Green:Phloxine-B 50:50 in ethanol. The rest of the visited and non-visited flowers were left in the plant and, at the time of fruit recollection, which was always done at red colour stage of the fruit, the fruits were weighed, measured their length width and external maximum diameter, and the number of seeds counted.

2.5. Number of pollen grain per anther

The number of pollen grains per anther was estimated as follows: One anther was excised and introduced in a microcentrifuge tube, 400 µl of sucrose 7% (w/v) in distilled water, were added and the tube was sonicated in an ultrasounds bath until the anther was empty. Then, an estimation of the number of pollen grain was carried out by counting the number of pollen grains in a certain volume by observing under microscope the number of pollen grain in a double Neubauer chamber (haemocytometer) (0.100 mm depth) (Brand GMBH, Germany).

2.6. Number of pollen grain on stigmas

More than 80 flowers were used in this evaluation. The number of visits to these flowers was recorded, and also their flower development stage and visit duration. Those flowers were excised and the number of pollen grains in their stigmas was estimated by observation at the microscope after staining with Methyl-Green:Phloxine-B as above.

2.7. Percentages of seed set per fruit and quality traits of fruit production

A percentage of seed set per fruit was calculated as the percentage of fertilized ovules per fruit. Not fertilized ovules disappeared by the time the fruits were collected, whereas the fertilized ovules appeared engrossed, bright and whitish, surrounded by the placenta. The number of ovules in each variety was estimated by counting the number of ovules of 10 ovaries taken from not fertilized flowers.

Apart from the flowers labelled and studied for pollen grain deposition, the whole plots of the greenhouse were harvested when the colour of the fruit has attained an uniform red coat, according to the Colorimeter CR-300 (Minolta) ($L = 39.845 \pm 4.74$; $a = -12.688 \pm 1.84$; $b = 17.013 \pm 5.60$) assessment. More than 300 samples of each treatment and cultivar, pollination or control (self-pollination), were brought to the laboratory and their quality traits measured for: unitary weight, length, width, external maximum diameter, pericarp thickness and number of seeds. Those data were used to build the correlation analysis and other analyses showed in Section 3.

Total yield was estimated by weighting all the fruits collected when the fruit coat turned red, as it is indicated above.

2.8. Statistic analysis

Statistical analysis: analysis of variance, comparisons of means, frequency distribution, multivariate analysis of variables, correlations and regression analysis were performed with the help of the statistic software Statgraphic Plus 4.0 and Statistix 8.0.

3. Results

3.1. Number of pollen grain per anther

The average number of pollen grain per anther was similar in both cultivars ($N = 20$; $P > 0.05$) $3.969.920 \pm 629.962$.

3.2. Influence of duration of visits versus number of visits on the number of pollen grains on stigma

A General Linear Model Analysis was applied to study the influence either of duration of visits or number of visits on the number of pollen grains on the stigma of the flowers. The categorical variable was number of visits and the quantitative variable was duration, being the dependent variable the number of pollen grains deposited on stigmas. The general ANOVA of this model had a P -value of 0.0001 ($N = 82$). Because the P -value in this ANOVA for pollen is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between pollen and the predictor variables at the 99% confidence level. The second ANOVA for pollen tests the statistical significance of each of the factors as it was entered into the model. P -value of number of visits is 0.0010 ($N = 82$), and P -value of duration of visits is 0.6275 ($N = 82$). Thus, the later term is not statistically significant.

Table 1
MANOVA results of the predictor variables on pollen grains per stigma

	Number of visits	Duration of visits
Wilks' lambda	0.801	0.997
F	6.035	0.237
P -value	0.0001	0.627

Table 2
MANOVA results of the predictor variables on seeds per fruit

	Number of visits	Number of pollen grains on stigma
Wilks' lambda	0.507861	0.633041
F	11.3055	20.2887
P -value	0.0001	0.0001

As a part of the General Linear Model, a Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) was carried out to compare the hypothesis of the influence of each predictor, number of visits and duration of visits. The results of this analysis are displayed in Table 1.

These statistics are used to determine whether a particular effect has a significant relationship with the dependent variable being modelled. P -values below 0.10 indicate that an effect is statistically significant at the 90% or higher confidence level. In this case, the most significant factor (according to Wilks' lambda) is number of visits.

The number of pollen grains (estimated) was related to number of seeds per fruit in a sample of flowers which were encapsulated after a series of visits observations. The number of visits was used to estimate the number of pollen grains per stigma of those flowers.

The General Linear Analysis made on that sample showed that the number of seeds per fruit was related with pollen grains and number of visits with a P -value of 0.0001. The P -value of the numbers of visits predictor had a P -value of 0.0001 and the number of pollen grains a P -value of 0.0001.

Manova results of this model are displayed in Table 2.

These statistics show that both predictors have influence on the model of number of seeds per fruit, although the number of visits had greater influence than the number of pollen grains, according to the Wilk's lambda value.

3.3. Percentages of seed set per fruit

The number of ovules per ovary of each cultivar was statistically different, as it is shown in Table 3.

Table 3
Means and standard errors of number of ovules per variety

Cultivar	Number of ovules	P -value
Bárdenas	489.455 \pm 34.1686 a	0.0481
Vergasa	591.182 \pm 34.1686 b	

Means followed by different letter indicate statistical significant differences at the 95% level of confidence.

Table 4

Averages and standard errors of percentage of seed set per fruit of the two campaigns of experimental culture per cultivar and pollination treatments

Cultivars	Culture campaigns		Pollination treatments	
	Year 2002–2003	Year 2003–2004	Bumblebees	Control
Bárdenas	40.12 a \pm 0.9	37.18 b \pm 0.8	49.81 a \pm 0.9	27.50 b \pm 0.9
Vergasa	36.82 a \pm 0.9	29.73 b \pm 0.8	40.79 c \pm 0.9	25.77 d \pm 0.9

Averages followed by different letters indicated that there was a statistical significant difference between them at the 99% level.

Percentage of seed set per fruit was compared between the two cultivars and the results are displayed in Table 4.

A regression line of the number of pollen grains on stigmas versus the number of bumble visits is shown in Fig. 1.

The regression analysis has been adjusted to an exponential model of the type $Y = \exp(a + b \times X)$, where Y = number of pollen grain per stigma; X = number of bumblebee visits; $a = 0.918968$; $b = 3.95851$; correlation coefficient = 0.709498; $R^2 = 50.3388\%$.

The relationship between seeds per fruit and visits is shown in Fig. 2. The regression equation better adjusted to the data is seeds = $164.046 + 116.24 \times \sqrt{\text{visits}}$, with a correlation coefficient = 0.589574; $R^2 = 34.7598\%$ and a standard error of estimation = 82.5458. Because the P -value for lack-of-fit in the ANOVA table is greater or equal to 0.10, the model appears to be adequate for the observed data.

3.4. Number of bumblebee's visits to pepper flowers

An estimation of the total number of visits of bumblebees to flowers on the pollination plot is shown in Fig. 3. The data displayed in that graphic are the average of more than 15 days of continuous observation during the months of September and October (2003), where there was a peak in blooming. As

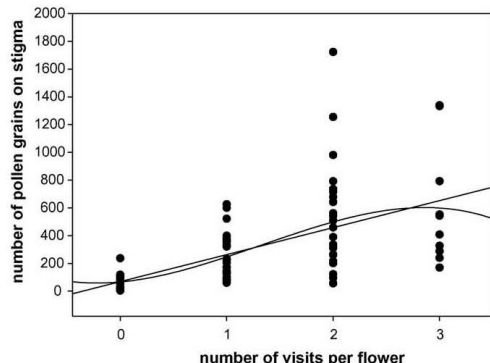


Fig. 1. The number of observed visits to the pepper flowers by bumblebees has been plotted against the number of pollen grains per stigma of those flowers, which were analysed by staining and microscopy according to Section 2. A regression line between number of pollen grains in stigma and number of bee visits to flowers was calculated and added to the plot, according to Section 3.

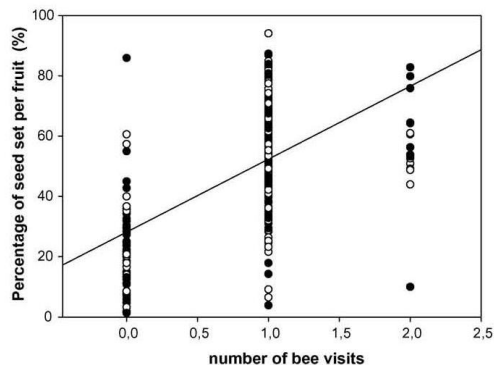


Fig. 2. The percentage of seed set per fruit of each fruit, which became from a labelled flower after zero, one or two visits by bumblebees, have been plotted. A regression line between percentage of seed set per fruit (%) and number of bee visits have been added according to Section 3.

it is indicated in the figure, the number of visits was very high and the frequency had several peaks depending of the hour of the day, but most of the visits were done during early morning.

3.5. Fruit quality variables

A Pearson's correlation analysis was carried out between all the fruit quality variables studied and its results are displayed in Table 5.

This analysis indicated that a good correlation existed between the variables indicated with an asterisk. Among them, the stronger correlations are those between seeds and percentage of seed set per fruit, followed by percentage of seed set per fruit and external maximum diameter, which has also a high correlation with number of seeds. Pericarp thickness had a good correlation with weight. Percentage of seed set per fruit was well correlated with all the fruit quality variables, except pericarp thickness and fruit length. Fruit length seems to be more related with external maximum diameter than with any

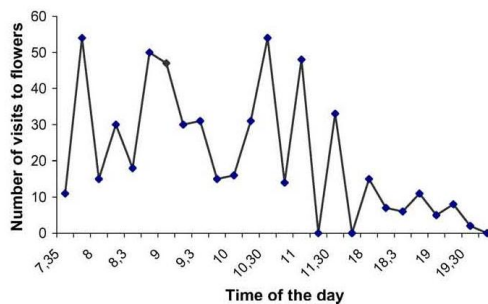


Fig. 3. Number of bumblebee's observed visits to pepper flowers in a typical autumn day at the greenhouse. There was a higher frequency of visits at early morning hours and this frequency decreased since afternoon and late afternoon.

Table 5

Pearson correlation coefficients and probability values of the relationships among pepper quality measures ($N = 1500$)

	Width	Maximum external diameter	Thickness	Length	Weight	Seeds
Maximum external diameter	0.2471* (0.0001)					
Thickness	0.0153 (0.6305)	0.1016* (0.0013)				
Length	0.1072* (0.0007)	0.3318* (0.0001)	0.0752 (0.0176)			
Weight	0.1159* (0.0002)	0.4199* (0.0001)	0.1938* (0.0001)	0.2761* (0.0001)		
Seeds	0.1798* (0.0001)	0.5961* (0.0001)	0.0346 (0.2758)	0.0744* (0.0189)	0.2214* (0.0001)	
Rate	0.1673* (0.0001)	0.5708* (0.0001)	0.0369 (0.2448)	0.0674 (0.0336)	0.2213* (0.0001)	0.9780* (0.0001)

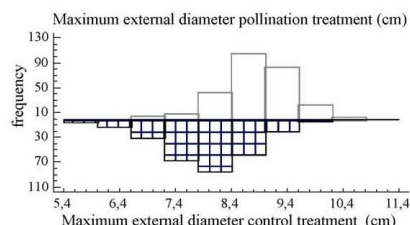
Values given in parenthesis are P -value. Correlations coefficients followed by asterisks indicated a statistical significant probability of correlations between variables.

Fig. 4. Histograms of frequencies of maximum external diameters (cm) of the pepper fruits, collected along the two campaigns and analysed according to Section 2. The blank columns are the results from the pollination treatment. The grid columns are the results from the control (self-pollination) treatment.

other variable. Probably, fruit length is more genetic determined than any other variable.

3.6. External maximum diameter frequencies

The histograms of frequency of the data for the external maximum diameter per fruit per treatment are shown in Fig. 4. External maximum diameter is the most common quality fruit trait used for grading commercially fresh peppers. As it can be seen in the graphic, the tendencies of frequencies had different distributions along the class marks.

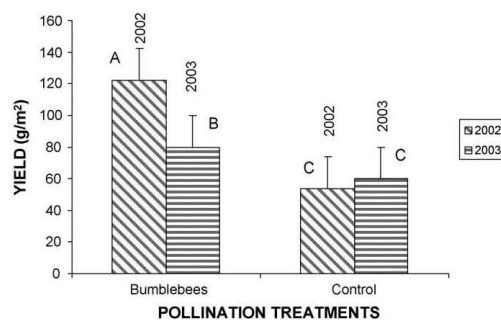


Fig. 5. Averages and standard errors of the total yield of the two campaigns expressed as g/m^2 of sweet pepper fruits. The columns with different letters indicate that there was a statistical significant difference between the averages at the 95% level.

3.7. Estimation of the yield

An estimation of yield per year of campaigns is displayed in Fig. 5, where the averages and standard errors of fruit weight per surface, pollination treatment and year are shown.

4. Discussion

Morandin et al. (2001a) found that duration of bumblebee visits to tomato flowers was highly variable, and, as a result, the number of bee visits to a flower may not be a good indicator of pollination level. However, it must be taken into account that tomato does not release pollen in the same way that pepper does. In fact, anther dehiscence of pepper flower is more related to the flower development stage (Roldán Serrano and Guerra Sanz, 2004) than in tomato. Therefore, the number of pollen grains on stigma is not only affected by the number of pollinator visits, but also by the flower developmental stage. The number of pollen grains deposited on the stigma varied in a statistical significant way according to the number of pollinator visits, reaching a maximum average of 591.2 pollen grains with three visits and the minimum average of 53.4 with 0 visits (corresponding to the control pollination treatment).

Jarlan et al. (1997) found that total contact duration of the fly, *E. tenax* (L.), on sweet pepper flowers was a better indicator of pollen transfer to the stigma than the number of visits to the flower which did not influence fruit characteristics, although pollen load on stigma was not measured in that study. In our case, the number of visits versus the pollen grains on stigma had a much stronger correlation than pollen grains on stigma versus duration of visits. This difference can be attributed to several causes, such as the different cultivars used in both studies, also to the different behaviour of the pollinators used, and to the environmental variables which can affect greatly the development of sweet pepper flowers. Another explanation of our results might be based on the floral biology of these cultivars (Pickersgill, 1997): the anthers of the cultivars used in this experiment are almost completely open at the end of the first day of flower anthesis (Roldán Serrano and Guerra Sanz, 2004), permitting the pollen grains falls freely on the stigma, with a minimal movement of the flower. The bumblebee visit to the flower causes an increase of the number of pollen grains falling on the stigma, when the bumblebee try to reach the nectar which is located far behind at the basis of the petals, which gives as a result an enormous agitation of the anthers. The

seeking for nectar by the bumblebee workers was a common behaviour found of this experiment (data not shown), in spite of the fact that the commercial hives were provided with a sugar syrup container. If the pollinator try to take pollen, that provokes also a great agitation of the anther, which make that more pollen grains falls on the stigma and around the flower. In both cases, either the pollinator try to reach the nectary or gathering pollen, the size of the bumblebee is so big in comparison with the flower, that makes that the whole flower be agitated.

The difference of yields between the years 2002 and 2003 in the pollination treatment was very accused (Fig. 5), but it could be attributed to the stronger temperature which was attained during the 2003 summer, where peaks of 51 °C of temperature were measured inside the greenhouse during several days. In any case, the statistical differences between treatments are a very interesting point for the farmers.

The external maximum diameter histograms (Fig. 4) show, very graphically, that the sizes between the fruits from each treatment had a distinct way of dispersion: pollination treatment frequency had two class marks above the maximum class mark of the control treatment, indicating that the pollination treatment fruits were more often on the 'upper' marks, meanwhile the distribution of the control treatment showed more 'smoothed' and more spread around all the class marks, giving place to a any kind of grading from a commercial point of view. This example of one of the quality traits analysed in this study, as the other quality traits (data not shown), proves that pollination by bumblebees improves the quality of fresh sweet peppers from a commercial point of view. If peppers were to be paid to the farmers by its grading quality, then, the choice for pollination treatment should be taken into account.

The percentages of seed set per fruit of the cultivars used in this experiment were different, attaining a maximum average of 49.8% for Bárdenas and 40.7% for Vergasa. These differences are mainly due to the different averages of ovules per ovary, because the number of bee visits recorded per cultivar was similar (data not shown), indicating no selective foraging by bumblebees in this case. Our results suggest that a full pollination is far from been attained even with the help of pollinators. This might be due to other functional aspects on the reproductive biology of these cultivars which are currently under further study by us. We can only speculate on the matter, but, probably is something dealing with the characteristics of the floral biology and reproduction of these cultivars.

Studies on various plant species (Shore and Barrett, 1984) have found that as pollen doses increases, so does seed set. There is also a large body of literature showing positive correlations among the number of seeds per fruit, fruit weight, sugar content, and fruit shape, as we have found. It should be noticed that the increase of seeds per fruit was strongly correlated with fruit weight and external maximum diameter, two variables very important from the commercial point of view. Typically, more pollinator visits result in better quality fruit (Morandin et al., 2001b). Pressman et al. (1998) found that in sweet peppers, greater number of manual pollinations per flower resulted in larger, improved shape fruit. They concluded

that an increase in the number of pollinations could greatly increase size and quality of yield. Our data indicate that the maximal pollination efficiency is reached with a number of visits between 1 and 2, which gives a maximum of 400 seeds per fruit.

In most species of flowering plants, cross-pollination (allogamy) is a common breeding mechanism. Outcrossing avoids the deleterious effects of inbreeding depression and promotes heterozygosity, genetic variability and genetic exchange. Plants have evolved various mechanisms to promote allogamy, and, sweet pepper flowers, although insect pollination is not strictly necessary, have some traits which have allowed taking advantages of them to increase the agricultural quality yield.

Acknowledgement

The authors thank to Agrobío, S.L. the support of part of this research.

References

- Abak, K., Dasgan, H.Y., Ikiz, Ö., Uygan, N., Kafianoglu, O., Yeninar, H., 1997. Pollen production and quality of pepper grown in unheated greenhouses during winter and the effects of bumblebees (*Bombus terrestris*) pollination of fruit yield and quality. *Acta Hort.* 437, 303.
- Baker, H.G., Baker, I., 1982. Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny, Y172. In: Nitecki, M.H. (Ed.), *Biochemical Aspects of Evolutionary Biology V. Proceedings of the Fourth Annual Spring Systematics Symposium*. University of Chicago Press, Chicago, p. 131.
- Baker, H.G., Baker, I., 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Isr. J. Bot.* 39, 157–166.
- Dag, A., Kammer, Y., 2001. Comparison between the effectiveness of honey bee (*Apis mellifera*) and bumble bee (*Bombus terrestris*) as pollinators of greenhouse sweet pepper (*Capsicum annuum*). *Am. Bee J.* 141 (6), 447–448.
- Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A., Mena Granero, A., Fernández López, C., 2005. Pollination in extra-early horticulture crops of Almería greenhouse framework. In: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A., Mena Granero, A. (Eds.), *Primeras Jornadas de Polinización de Horticolas*. CIFA La Mojonera (IFAPA), Almería, Spain, pp. 97–112.
- Jarlan, A., De Oliveira, D., Gingras, J., 1997. Effects of *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) pollination on characteristics of greenhouse sweet pepper fruits. *J. Econ. Entomol.* 90 (6), 1650–1654.
- Jarlan, A., De Oliveira, D., Gingras, J., 1998. Pollination by *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) and seed set of greenhouse pepper. *J. Econ. Entomol.* 90 (6), 1647–1649.
- Kristjansson, K., Rasmussen, K., 1991. Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) with the solitary bee *Osmia cornifrons* (Rasoszkowski). *Acta Hort.* 288, 173–177.
- Kubisova, S., Haslbachova, H., 1991. Pollination of male-sterile green pepper line (*Capsicum annuum* L.) by honeybees. *Acta Hort.* 288, 364–369.
- Mann, L.K., 1943. Fruit shape of watermelon as affected by placement of pollen on stigma. *Bot. Gaz.* 105, 257–262.
- McGregor, S.E., 1976. Eggplant, pepper, tomato. In: *Insect Pollination of Cultivated Plants*, U.S.D.A., Washington, DC, pp. 213–215; 292–295; 357–361.
- Meisels, S., Chiasson, H., 1997. Effectiveness of *Bombus impatiens* Cr. as pollinators of greenhouse sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Acta Hort.* 437, 425–429.
- Morandin, L.A., Laverty, T.M., Kevan, P.G., 2001a. Effect of bumble bee (Hymenoptera: Apidae) pollination intensity on the quality of greenhouse tomatoes. *J. Econ. Entomol.* 94 (1), 172–179.

- Morandin, L.A., Lavery, T.M., Kevan, P.G., 2001b. Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and pollination levels in commercial tomato greenhouses. *J. Econ. Entomol.* 94 (2), 462–467.
- Morandin, L.A., Lavery, T.M., Kevan, P.G., Khosla, S., Shipp, 2001c. Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and loss in commercial tomato greenhouses. *Can. Entomol.* 133, 883–893.
- Percival, M.S., 1961. Types of nectar in angiosperms. *New Phytol.* 60, 235–281.
- Pickersgill, B., 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96, 129–133.
- Pressman, E., Moshkovitch, H., Rosenfeld, K., Shaked, R., Gamliel, B., aloni, B., 1998. Influence of low night temperatures on sweet pepper flower quality and the effect of repeated pollinations, wit viable pollen, on fruitsetting. *J. Hort. Sci. Biotech.* 73 (1), 131–136.
- Rabinowitch, H.D., Fahn, A., Meir, T., Lensky, Y., 1993. Flower and nectar attributes of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants in relation to their attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Ann. Appl. Biol.* 123, 221–232.
- Roldán Serrano, A., Guerra Sanz, J.M., 2004. Dynamics and sugar composition of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) nectar. *J. Hort. Sci. Biotech.* 79 (5), 717–722.
- de Ruijter, A., Eijndel, J., Steen, J., 1991. Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in greenhouses by honeybees. *Acta Hort.* 288, 270–274.
- Shipp, J.L., Whitfield, G.H., Papadopoulos, A.P., 1994. Effectiveness of the bumble bee, *Bombus impatiens* Cr. (Hymenoptera: Apidae), as a pollinator of greenhouse sweet pepper. *Sci. Hort.* 57, 29–39.
- Shore, J.S., Barrett, C.H., 1984. The effect of pollination intensity and incompatible pollen on seed set in *Tumeria ulmifolia* (Turneraceae). *Can. J. Bot.* 62, 1298–1303.
- Visser, T., Verhaegh, J.J., 1987. The dependence of fruit and seed set of pear and apple on the number of styles pollinated. *Gartenbauwissenschaft* 52, 13–16.
- Winsor, J.A., Davis, L.E., Stephenson, A.G., 1987. The relation between pollen load and fruit maturation and the effect of pollen load on offspring vigour in *Cucurbita pepo*. *Am. Natur.* 129, 643–656.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de nectarios es propia de las Angiospermas, aunque también se han encontrado en algunas Gimnospermas (Bino *et al.*; Wetschnig y Depisch; ambos citados por Pacini *et al.*, 2003). Tanto su morfología, como su posición, están relacionadas con el tipo de polinizador que visita la planta, con la forma en la que se realiza la carga y descarga del polen y con la predación (Pacini *et al.*, 2003). En las ocho hortícolas más cultivadas en Almería se encuentran nectarios localizados en la flor, exceptuando los cultivares de tomate y berenjena, a pesar de que las solanáceas los presentan desde sus ancestros (Bernardello, 2007). Esta situación permite que el néctar esté protegido, en mayor o menor grado, de la evaporación y de los polinizadores. Por sus características florales, se puede considerar que el calabacín y el pimiento presentan la melitofilia como síndrome de polinización. Sin embargo, el hecho de que el néctar de pimiento se produzca en pequeños volúmenes (no más de 10 μ l) y esté más expuesto que el de calabacín, menos accesible y más abundante (hasta 100 μ l) (**figura 14**), hace que se intuyan visitas de polinizadores distintos. En el caso del pimiento, se esperan polinizadores inespecíficos y de pequeño tamaño, porque la recolección es sencilla y necesitan poco alimento para volar, mientras que en calabacín se supone que los polinizadores presentarán un mayor grado de especialización y serán de mayor tamaño.

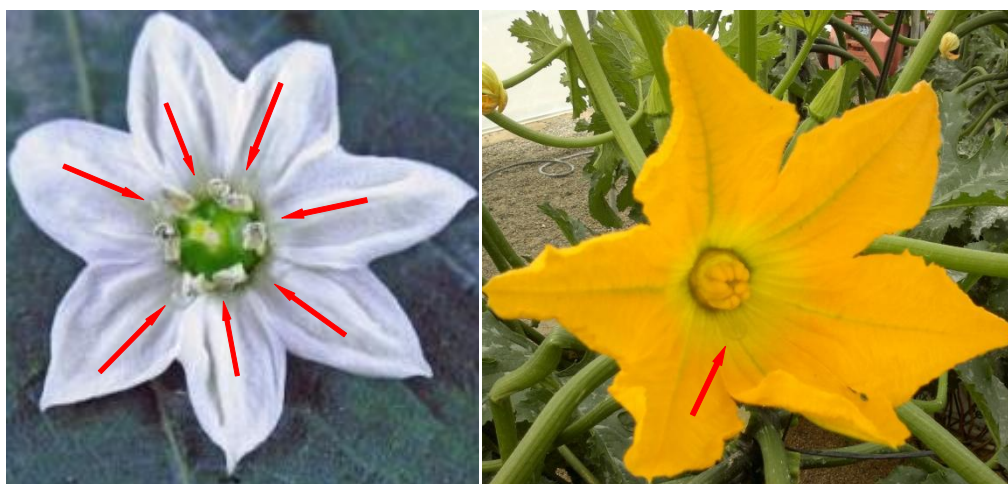


Figura 14. Izquierda: Detalle de las gotas de néctar sobre los pétalos de una flor de *Capsicum annuum* cv. Bárdenas. Derecha: Gota de néctar cayendo del nectario de una flor hembra de *Cucurbita pepo* cv. Zuchino.

Después de más de tres décadas dedicadas al estudio del néctar, por parte del matrimonio Baker y otros investigadores, hoy se sabe que es más que una simple solución azucarada y que el estudio de su composición en azúcares, de sus concentraciones y sus cantidades relativas, son relevantes para los estudios de la biología de la polinización, la ecología de los polinizadores y la sistemática de plantas (Kevan, 2003). Los resultados obtenidos con el presente trabajo han contribuido a los anteriores trabajos mediante: la determinación, por primera vez, de la presencia generalizada de sacarosa en pimiento, así como de trazas de rafinosa detectadas en algunos cultivares; la evaluación de la ratio de azúcares, durante la antesis floral y hora de recolección; la muestra de diferencias entre los cultivares tanto en la producción de néctar como en su composición. En calabacín, se ratificaron los resultados de Nepi y Pacini (1993) y Nepi *et al.* (1996 y 2001), detectando los tres azúcares principales (sacarosa, glucosa y fructosa) en cuatro cultivares (Zuchino, Afrodite, Cora y Elite), distintos al único estudiado por ellos, así como diferencias de cantidad y composición entre sexos. De la misma forma, estos azúcares se encontraron en sandía (*Citrullus lanatus*), junto con trazas de rafinosa y estaquiosa, melón (*Cucumis melo*), pepino (*Cucumis sativus*) y judía (*Phaseolus vulgaris*) (Guerra-Sanz *et al.*, 2005). Las ratios sacarosa / hexosas (Baker y Baker, 1983a) obtenidas en estas especies, así como en pimiento y calabacín, ratificaron que en la familia *Cucurbitaceae* (Pacini *et al.*, 2003) y *Fabaceae* (Webster *et al.*, 1982) prevalece el contenido en sacarosa respecto a las hexosas, mientras que las *Solanaceae*, por lo general, son prevalentes las hexosas (Galletto y Bernardello, 2003; Torres *et al.*, 2013). Este resultado ayuda a explicar el porqué de las preferencias de los abejorros por las dos primeras familias, frente a las solanáceas, cuando se utilizan en cultivos multiespecíficos (dedicados, por lo general, a la producción ecológica) o multivarietales de los invernaderos del sureste español. Si bien, debemos tener en cuenta que existen diferencias de concentración de azúcares entre especies y cultivares de la misma especie y, en el caso de plantas monoicas, entre flores de distinto sexo, que hacen la predicción de la elección de cultivos algo más compleja.

El hecho de que la ratio de azúcares, tanto en pimiento (**artículo 2: figuras 6 y 8**) como en calabacín (**artículo 1: figura 2**), sufriera un descenso progresivo durante la antesis floral y que la concentración de sacarosa, conforme las muestras de néctar se recolectaban en meses más calurosos, se redujera en

pimiento (**artículo 2: figura 2**) y se incrementara en calabacín (**artículo 1: figura 3a**), sugieren que existe una sincronía con el momento de mayor afluencia de los polinizadores, porque éstos encontrarán más recompensa y de mejor calidad. La confirmación a dicha hipótesis se obtuvo de la evaluación de la actividad polinizadora, que mostró una mayor frecuencia de visitas de los abejorros entre las 9 h y 11 h de la mañana (Abak y Dasgan, 2005), en ambas especies, coincidiendo con el momento de mayor secreción de néctar (**artículo 3: figura 3**). Además, en el caso de las flores hermafroditas del pimiento, el mayor número de visitas se observó entre los estadios 1 y 2 de antesis, con preferencia por el primero. Es lógica esta mayor afluencia en el estadio 1 puesto que se encontró la mayor concentración de sacarosa y la mayor producción de néctar (**artículo 2: tabla 3, figuras 5 y 6**). En calabacín, teniendo en cuenta la presencia de flores con distinto sexo, se observó una mayor afluencia de los abejorros a las flores femeninas, hecho que era de esperar puesto que éstas producen néctar en mayor cantidad y concentración que las masculinas (Roldán-Serrano *et al.*, 2002b; Nepi y Pacini, 1993; Nepi *et al.*, 1996 y 2001).

En los cultivares estudiados de ambas especies, se observaron variaciones en la producción del néctar que sugieren una influencia del genotipo; aunque en pimiento, cuyo periodo de floración es largo, también se generan variaciones estacionales e individuales en las flores debido a que el néctar tiene su origen en el floema (Fahn, 2000). Dichas oscilaciones parecen tener cierto efecto sobre el comportamiento de los abejorros. En pimiento, los abejorros visitaron con mayor asiduidad los cultivares con mayor producción de néctar (tipo california) en comparación con los de menor o nula producción (tipos padrón y picante) (datos no publicados). En calabacín, los abejorros mostraron una preferencia por el cv. Zuchino (43,28%), en el que se detectó el mayor valor de la ratio sacarosa / hexosas, respecto al resto (**artículo 1: figura 1**). Esto, unido a los estudios previos realizados sobre otras características de la flor de calabacín (Roldán-Serrano *et al.*, 2002b), muestra que el abejorro tiene predilección por cultivares que producen un elevado ratio sacarosa / hexosas en el néctar.

Los resultados en relación al néctar proporcionan un primer argumento para pensar en el abejorro como un buen polinizador en horticolas de invernadero. Por otra parte, en frutos multiseñillados, como es el caso del calabacín y del pimiento, la calidad del fruto viene determinada, en gran medida, por el número

de semillas presentes en el mismo, y este parámetro es muy dependiente del número y calidad de las visitas que el polinizador realice a la flor, pues esto va a condicionar la carga polínica depositada en los estigmas y, por ende, el número de óvulos fecundados. A su vez, el número de visitas realizadas por el polinizador a una flor dependerá de factores relacionados con diferentes parámetros de la biología reproductiva de la especie en cuestión y de sus características florales, entre las que se incluye el néctar como estímulo gustativo y recompensa alimenticia.

Así, en cuanto a las características florales del pimiento, en los cultivares objeto de estudio se observó que el diámetro floral puede variar de unas a otras y que la antesis floral tiene una duración de tres días (**artículo 2: tabla 2**) en condiciones climatológicas óptimas, mientras que puede alargarse a dos o tres más, cuando el clima es invernal. La longitud del estilo y la posición relativa del estigma, respecto a las anteras, fueron las adecuadas durante los días 1 y 2 de antesis para que el polen se depositara sin dificultad sobre el estigma de la misma flor y, tan sólo en el día 3, con una mayor apertura floral, se observó separación suficiente entre ambos órganos sexuales para que esa deposición no continuara (**figura 15**). Sin embargo, se detectó una maduración diferencial de las anteras, respecto al estigma, de tal modo que la viabilidad del polen fue máxima en el estadio 2 de floración, coincidiendo con la total dehiscencia de las anteras, mientras que la máxima viabilidad del estigma no se alcanzó hasta el estadio 3 (**artículo 2: figura 4**). Dicho comportamiento parece indicar cierto grado de dicogamia con tendencia a la protandria (Marfutina, cit. por Nuez *et al.*, 1996; McGregor, 1976), que puede estar asociado tanto al tipo de pimiento, en nuestro caso “california”, como al cultivar. Además, el número de óvulos fue diferente entre cultivares (**artículo 3: tabla 3**) y se obtuvo un incremento en el porcentaje del número de semillas en frutos polinizados con abejorros, 15,02% en cv. Vergasa y 22,31% en cv. Bárdenas (**artículo 3: tabla 4**), que mostró una mejor eficiencia del proceso de polinización. Estos resultados sobre la biología floral y reproductiva en los cultivares de pimiento estudiados, sugieren la necesidad de realizar estudios más exhaustivos en los cultivares modernos; puesto que los resultados en pimientos de tipo grueso, plantados en invernadero del mediterráneo español (Nuez *et al.*, 1996) y en *C. frutescens* (Odland y Porter, 1941), en general, muestran valores muy diversos que deben tenerse en cuenta a la hora de decidir la

necesidad de la introducción de colmenas de abejorros.



Figura 15. Patrón de apertura floral y disposición de las anteras, respecto al estigma, en pimiento.

En los cultivares estudiados de calabacín, al igual que describieron Nepi y Pacini (1993), la antesis floral duró 6 horas en ambos sexos aunque, en las flores masculinas, se adelantó en torno a una media hora. El *cv.* Zuchino fue el que mayor número de flores masculinas produjo (ratio ♀ / ♂ = 0,45) frente a *cv.* Cora (ratio ♀ / ♂ = 0,75) o *cv.* Afrodite y *cv.* Elite (ratio ♀ / ♂ = 0,65) (Roldán *et al.*, 2002b). La ratio flor femenina / masculina en esta especie viene determinada genéticamente, aunque se ve influida por las condiciones ambientales (NeSmith *et al.*, 1994; Stapleton *et al.*, 2000). Esta característica es muy interesante ya que los cultivares con una ratio semejante al *cv.* Zuchino pueden utilizarse como polinizadoras en invernadero, junto con otros que tengan escasez de flores machos, para asegurar la presencia de polen durante un periodo de tiempo más prolongado. El volumen de corola fue diferente entre sexos, siendo mayor en las flores femeninas, y entre cultivares, siendo menor en *cv.* Cora y *cv.* Zuchino que en *cv.* Afrodite y *cv.* Elite (Roldán *et al.*, 2002b). Aunque los trabajos en la presente tesis no han ahondado más en este parámetro, no debe obviarse puesto que, en abejorros, se ha estudiado que el aprendizaje asociativo tamaño de flor-cantidad de néctar está implicado en la formación de preferencias por grandes

Tesis Doctoral

flores (Blarer *et al.*, 2002). Respecto a la viabilidad del polen, no se observaron variaciones tan drásticas a lo largo del día como en el pimiento, manteniendo unos porcentajes bastante elevados en todos los cultivares (Roldán *et al.*, 2002b). Sin embargo, en mediciones posteriores (datos no publicados) se obtuvieron resultados equivalentes a los publicados por Nepi y Pacini (1993), porcentajes elevados de viabilidad a 1ª y 2ª hora de observación (8 h y 10 h de la mañana, respectivamente), sin diferencias entre cultivares, y se detectó una pequeña disminución de la viabilidad, a última hora (1 h de la tarde), que no fue cuantificada entre cultivares.

En cualquier caso, aunque algunas de estas características florales motivan la presencia de vectores de polinización a lo largo de la antesis floral, para que el transporte de polen sea efectivo y, en consecuencia, los frutos sean de calidad, es fundamental evaluar la eficacia de las visitas de los abejorros a las flores. En pimiento, con independencia de las cultivares, dichas visitas incrementaron la cantidad de carga polínica depositada en los estigmas de las flores y el número de semillas en fruto (alrededor de un 20%). La duración de las visitas no fue relevante para el primer parámetro, pero sí para el segundo; mientras que el número recibido por cada flor afectó favorablemente a ambos parámetros (**artículo 3: tablas 1, 2 y 3**). A su vez, se observó que una única visita fue suficiente para conseguir un 85% de semillas en fruto, a pesar de que la carga máxima de polen en estigma se consiguió con dos visitas (**artículo 3: figuras 1 y 2**). En calabacín, el fruto alcanzó talla comercial con una única visita del abejorro; no obstante, la media de semillas por fruto se incrementó significativamente con más de una visita (**artículo 1: tabla 1**). El hecho de que, en ambos cultivos, se produjera un incremento de la presencia de semillas tuvo una repercusión positiva en la formación de los frutos y, por tanto, en su calidad. En pimiento, tanto en los análisis previos (Roldán-Serrano y Guerra-Sanz, 2004) como al final del periodo de experimentación, el porcentaje de semillas en fruto estuvo bien correlacionado con la mayoría de los parámetros analizados (**artículo 3: tabla 5**), mostrando una mejora de la calidad de los frutos de manera sostenida y consistente ante la polinización entomófila añadida (**figura 16**). De todos ellos, cabe destacar el diámetro máximo externo o calibre por ser el parámetro más utilizado a la hora de valorar la calidad comercial de los pimientos frescos (Reglamento Comisión Europea nº 1455 / 1999) (**artículo 3: figura 4**). En las parcelas de calabacín

donde se utilizó la polinización con abejorros, se observó una mayor producción de frutos comerciales y menor cantidad de destrío respecto a las parcelas en las que se indujo fruto con fitohormonas (Guerra-Sanz *et al.*, 2004; Roldán *et al.*, 2011).

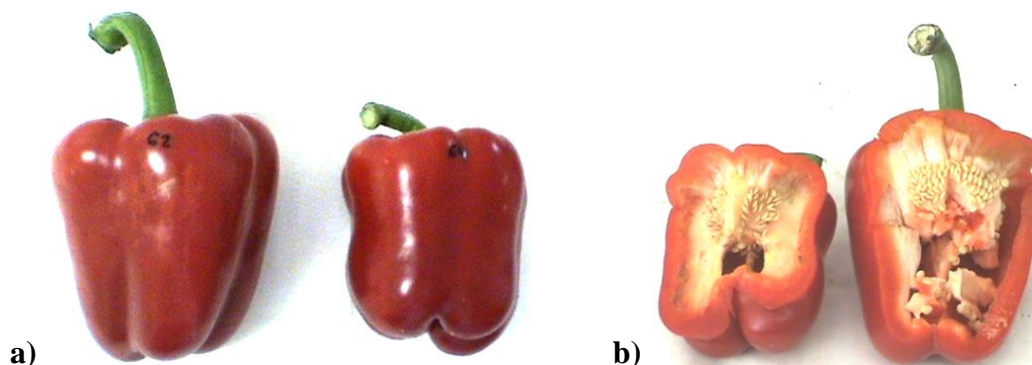


Figura 16. Características morfológicas de un fruto de pimiento polinizado por abejorros (a: izquierda; b: derecha) y sin abejorros (a: derecha; b: izquierda).

En general, teniendo en consideración el punto de vista del consumidor, el incremento del número de semillas por fruto podría suponer una desventaja a la hora de cocinarlos, sin embargo esto no es así. En pimiento, el peso de las semillas no tiene influencia sobre el peso total del fruto, siendo el mesocarpio el que aporta el 99% del total (Roldán-Serrano y Guerra-Sanz, 2003). Además, la disposición apiñada de las semillas y su inserción en el ovario permiten retirarlas con facilidad. En calabacín, sin embargo, el fruto se recoge inmaduro, por lo que sus semillas también lo son, y, aunque están dispersas a lo largo de toda la parte comestible, su cubierta seminal aún no se ha endurecido lo suficiente para que menosprecie la degustación.

En cuanto a la producción, en pimiento se consiguió incrementarla utilizando polinización con abejorros (**artículo 3: figura 5**), con independencia del cultivar, aunque fue mayor en la primera campaña (20% de mejora) que en la segunda (5% de mejora) de cultivo. Estos resultados se atribuyen a las condiciones de temperaturas extremas del invernadero que rondaron los 51 °C durante varios días de la segunda campaña, y propiciaron pérdidas de flores y frutos (Thompson y Kelly, 1957). A pesar de la considerable diferencia entre campañas, estos resultados son interesantes puesto que guardan semejanza con el incremento del 4% en la cosecha media de pimientos, en invernaderos de investigación, y el 29,6%, en invernaderos comerciales, obtenidos por Abak *et al.* (1997). En calabacín, la producción obtenida en ensayos llevados a cabo con abejorros en

fincas comerciales se igualó a la obtenida utilizando fitohormonas (Roldán *et al.*, 2011), mientras que en los realizados en fincas de investigación se obtuvo un incremento que fue significativamente mayor en función de la cantidad de polinizadores presentes (Guerra-Sanz *et al.*, 2004; Meca-Abad y Gázquez-Garrido, 2007a y 2007b). En ambos casos, se redujo la cantidad de destrío y, por tanto, de frutos deformados, aún cuando Meca-Abad y Gázquez-Garrido (2007a y 2007b) indicaron que los frutos polinizados por abejorros eran menos uniformes. Esta afirmación se cree que no está relacionada con la mera presencia de los polinizadores; ya que la presencia de frutos irregulares también puede estar relacionada con el cultivar seleccionado, las variaciones de la climatología durante el cultivo y el manejo realizado de las colmenas. Cabe señalar que, en ambos cultivos, el incremento en producción viene determinado por el mayor peso y tamaño de los frutos y no por un incremento en el número de frutos (**figura 17**).



Figura 17. Frutos polinizados por abejorros en pimiento (izquierda) y calabacín (derecha).

Los resultados expuestos demuestran que la introducción de abejorros puede suponer una importante mejora en la productividad en los cultivos bajo plástico de pimiento y calabacín. El abejorro ha resultado ser versátil y un buen polinizador, a pesar de que los dos cultivos presentan estímulos gustativos (tipo y proporción de azúcares en el néctar), visuales (morfología y color floral) y olfativos (tipo y proporción de volátiles en néctar) muy distintos para promover la polinización cruzada. Así, en pimiento, aunque la producción de néctar, su composición en azúcares y el modo de exposición a los polinizadores permiten pensar que está mejor adaptado a la polinización por abejas de pequeño tamaño, la investigación desarrollada confirma que el uso de abejorros mejora el número de semillas por fruto y, por ende, la calidad de los mismos, debido a una mayor deposición de polen sobre los estigmas. En calabacín, el hecho de que las flores femeninas produzcan más cantidad de néctar y esté más expuesto para facilitar su

recolección, frente a las masculinas, puede sembrar una duda respecto a la eficacia polinizadora de los abejorros en este cultivo. En principio, se puede pensar que las flores masculinas son menos atractivas; sin embargo, tras valorar la composición de volátiles en el néctar, se observó que, aunque había gran semejanza entre ambos sexos, producían una mayor concentración que las flores femeninas (Mena-Granero *et al.*, 2004). Este resultado puede relacionarse con una mayor dificultad de los polinizadores para llegar a los nectarios en las flores masculinas. Bajo esta situación, se deduce que el mecanismo de polinización cruzada en esta especie es sofisticado. Por un lado, la planta anima al polinizador para que visite las flores masculinas produciendo un aroma más intenso que favorezca el encuentro; mientras que, por otro, dificulta la recolección del néctar, con un nectario más escondido que en la femenina, para que el polinizador tenga que hacer un mayor esfuerzo. De este modo, y teniendo en cuenta que se esperan polinizadores de gran tamaño por tener un ratio sacarosa dominante (Baker y Baker 1983a, 1983b y 1990; Lammers y Freeman, 1986), la presencia de distintos patrones de recolección de néctar entre los sexos, optimiza la recolección y deposición del polen por los polinizadores (Nepi y Pacini, 1993). Así, el abejorro, en su afán por encontrar el ansiado manjar, puede producir pequeños movimientos en la flor que ayudan a que el polen se desprenda de la antera y precipite sobre él, y/o puede restregar su cuerpo por error en la antera, en el caso de que no sea la recompensa primaria.

Desde un punto de vista botánico, las principales especies hortícolas producidas en los invernaderos del sureste español pertenecen a tres familias (solanáceas, cucurbitáceas y fabáceas) de las que están bastante bien definidas, en condiciones naturales, su biología reproductiva y sus características florales (Guerra-Sanz *et al.*, 2005). Sin embargo, las diferencias encontradas entre los cultivares estudiados, sin olvidar que las adaptaciones de las angiospermas se deben más a la eficiencia reproductiva que a la supervivencia en sí (Stebbins, cit. por Herrera, 2009), deben alertar a los mejoradores vegetales para que promuevan la creación de cultivares mejor adaptados a la polinización entomófila. En pimiento, se deben potenciar cultivares con producción alta de néctar. En calabacín, *cv.* Zuchino o *cv.* Milenium pueden ser referentes a la hora de conseguir otros nuevos, puesto que producen gran cantidad de néctar. Además, en el caso de *cv.* Zuchino, la producción de flores (ratio ♀ / ♂ = 0,45) está bastante

equilibrada a lo largo de todo el cultivo. El hecho de que no se prolongue en demasía la producción de un único sexo al inicio y final del cultivo de esta especie, permitirá que el suministro de polen para los polinizadores esté asegurado durante un rango más extenso de tiempo.

La versatilidad del abejorro es un argumento válido para que su aplicación se haga extensiva a la mayoría de las hortalizas cultivadas bajo plástico, siempre que se realice un diseño de polinización adecuado a la fisiología de cada una, basado en la formulación de las colmenas y en el número de éstas a utilizar por hectárea. Para ello, es imprescindible que los requerimientos claves para el desarrollo de las colmenas de abejorros, néctar y polen, estén presentes en el cultivo y tengan la mejor composición (Huffaker y Rabb, 1984; Gouldson, 2003; Roldán-Serrano *et al.*, 2005). Cuando no hay néctar, el problema se solventa añadiendo jarabe sustitutivo a la colmena, mientras que, cuando el polen es de escasa calidad o de difícil recolección para los abejorros, se soluciona añadiendo una cantidad de polen extra al nido, de tal manera que permita que la vida media dentro del invernadero sea la prevista. Esta opción se contempla en calabacín (Roldán *et al.*, 2011) porque la antesis floral dura una mañana y el polen es más grande, pegajoso y espiculado que el de pimiento (**figura 18**). Estas características no permiten a los abejorros recolectar la cantidad suficiente para la alimentación de las larvas porque no pueden transformarlo en bola y colocarlo en la corbícula (salvo en algunos casos, como *cv.* Milenium) (**figura 19**). Además, el abejorro, ante la posibilidad de elegir entre el polen de este cultivo o de pimiento, prefiere el último por tener mayor cantidad de azúcares y proteínas totales (Roldán-Serrano *et al.*, 2005).

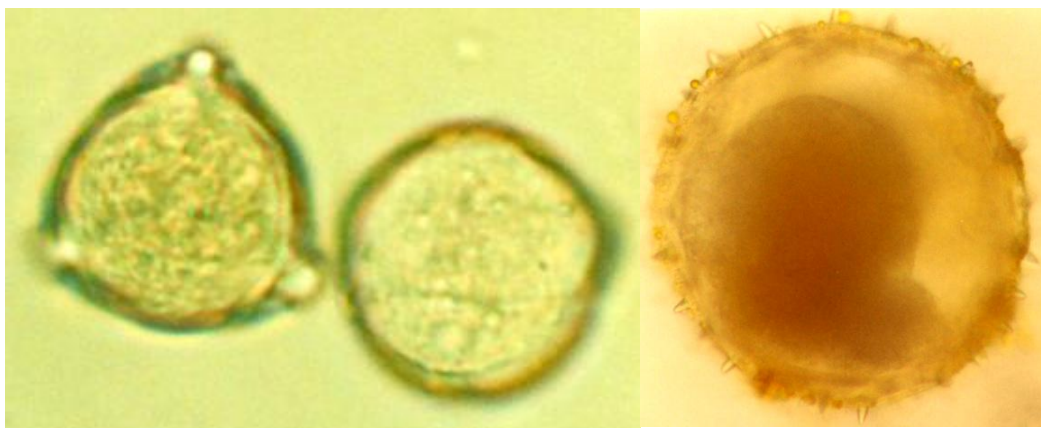


Figura 18. Morfología de grano de polen de pimiento (izquierda) y de calabacín (derecha).

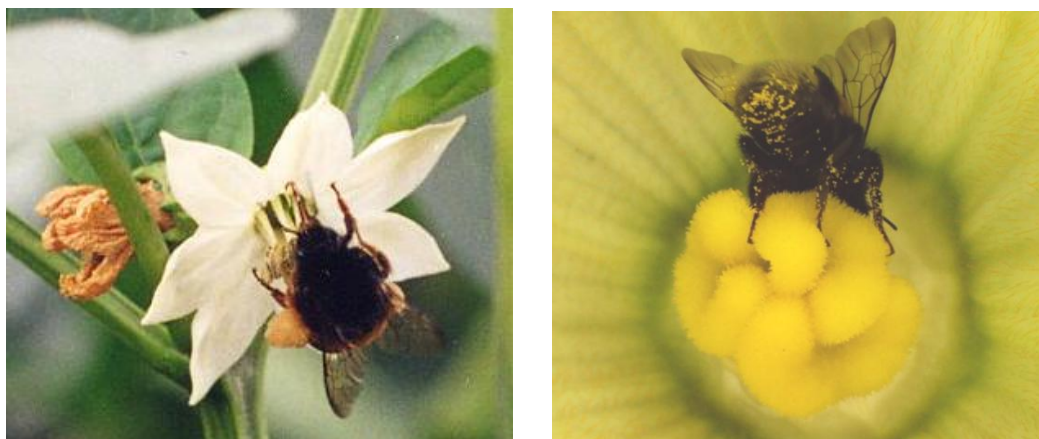


Figura 19. Abejorros recolectando néctar en pimiento, con polen almacenado en la corbícula (izquierda), y en calabacín, con el cuerpo cubierto de polen (derecha).

Desde un punto de vista global, si se continúa con estas investigaciones, se piensa que aún existe un amplio margen de mejora en la producción y calidad de fruto en calabacín y pimiento, así como en el resto de las hortalizas del sureste español, en cuanto a competitividad con otros mercados. Sobre todo, después de haber confirmado que las relaciones planta - polinizador no son tan estrictas como, en un principio, cabría esperar. Además, es necesario realizar un gran esfuerzo de divulgación para que el sector hortícola español y, en especial, agricultores y técnicos, conozcan estas nuevas metodologías.

Los resultados obtenidos en pimiento y calabacín son un argumento válido para que se favorezca el uso de abejorros en el resto de hortalizas cultivadas bajo plástico en el sureste español. Sin embargo, debido a que las características florales difieren entre especies y entre cultivares, es necesario realizar una evaluación técnica que permita valorar si es rentable la utilización de abejorros en ellas; si las colmenas se deben variar de los estándares de producción para tomate, frutales u ornamentales; si es necesario algún cuidado específico, como ocurre en calabacín; si van a interferir o servir de ayuda en los protocolos de Producción Integrada, especialmente, cuando haya presencia de enfermedades o se estén utilizando organismos de control biológico en los cultivos.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. *Bombus terrestris* (L.) es un buen polinizador de *Cucurbita pepo* (L.) y *Capsicum annuum* (L.), a pesar de que ambas especies presentan estímulos gustativos, visuales y olfativos muy distintos para promover la polinización cruzada.

2. Los principales azúcares encontrados en el néctar de ambas especies son sacarosa (por primera vez descrito en pimiento), glucosa y fructosa. La ratio sacarosa / hexosas es distinta, en pimiento predominan las hexosas y en calabacín, la sacarosa.

3. El néctar aparece como un parámetro importante para que los mejoradores vegetales desarrollen cultivares con flores atractivas para los polinizadores. Para ello, deben tener en cuenta que los volúmenes de néctar y la ratio de azúcares fluctúan en función de las condiciones ambientales y del cultivar.

4. La máxima actividad polinizadora del abejorro se produce cuando las características florales del calabacín y del pimiento se encuentran en las mejores condiciones para favorecer la alogamia. Es decir, en calabacín se observó una buena actividad entre las 8 h y 10 h de la mañana, coincidiendo con la máxima apertura floral, con una óptima maduración del polen para la fecundación y con la mejor secreción de néctar, tanto en contenido de azúcares como en volumen. En pimiento, la máxima actividad se produjo durante los estadios 1 y 2 de antesis, en torno a las 10,30 h de la mañana, hora en la que se observó la mayor secreción de néctar (2 μ l). En el estadio 1, la concentración de sacarosa fue la más elevada (102,58 g / l) respecto al estadio 2 y 3 (8,96 y 0,02 g / l, respectivamente) y en el estadio 2 de antesis, el volumen de néctar y la maduración del polen (43%) alcanzaron los valores más altos de toda la antesis.

5. El abejorro es un polinizador adecuado y eficiente en calabacín. No obstante, es necesario ahondar en otros parámetros como la composición en volátiles de las flores de ambos sexos, el tamaño de la corola o las características del polen, que expliquen mejor la interacción con este insecto.

6. La producción de néctar, la composición en azúcares y modo de exposición a los polinizadores permiten pensar que el pimiento está mejor adaptado a la polinización por abejas de pequeño tamaño. Pese a ello, hemos

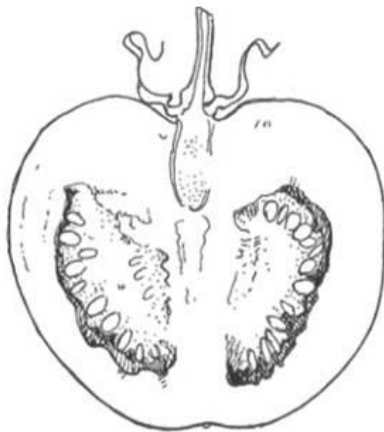
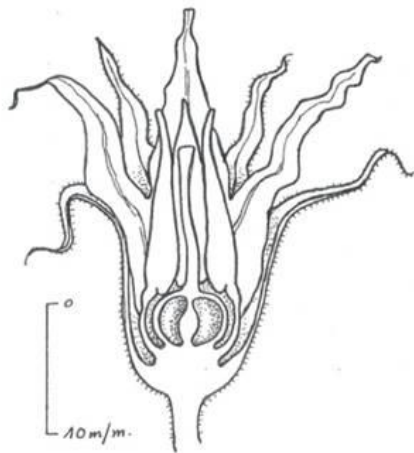
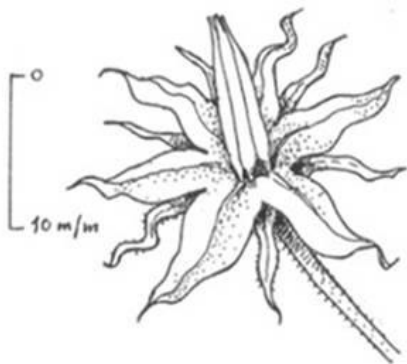
observado que el abejorro se adapta bien a este cultivo pues incrementa la deposición media de granos de polen sobre los estigmas con un número reducido de visitas (de 53,4 granos, sin visitas del polinizador, a 591,2 granos, con tres visitas del polinizador).

7. La polinización con abejorros ha mejorado de forma significativa la mayoría de los parámetros de calidad (número de semillas, peso de fruto, calibre, grosor de pared, largo y ancho de fruto) medidos en pimiento, siendo el más representativo el calibre. El mayor número de semillas encontrado repercute en un mayor engrosamiento de la pared, mayor homogeneidad y en un mayor tamaño y peso del fruto.

8. El uso de abejorros en pimiento incrementó la producción de un 5% a un 20%, en función de las condiciones climatológicas.

9. Teniendo en cuenta que la mayor parte de las especies hortícolas cultivadas bajo plástico en el sureste español pertenecen a las familias *Cucurbitaceae* y *Solanaceae*, los resultados obtenidos en calabacín y pimiento avalan el empleo del abejorro como un buen polinizador de estos cultivos.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas

Abak, K., Sari, N., Paksoy, M., Kaftanoglou, O. y Yeninar, H. (1995). Efficiency of bumblebees on the yield of eggplant and tomato grown in unheated greenhouses. *Acta Horticulturae*, 412: 268-274.

Abak, K., Dasgan, H.Y., Ikiz, O., Uygun, N., Sayalan, M., Kaftanoglu, O. y Yeninar, H. (1997). Pollen production and quality of pepper grown in unheated greenhouses during winter and the effects of bumblebees (*Bombus terrestris*) pollination on fruit yield and quality. *Acta Horticulturae*, 437: 303-307.

Abak, K. y Dasgan, H.Y. (2005). Efficiency of bumblebees as pollinators in unheated or anti-frost heated greenhouses. En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 19-29.

Alford, D.V. (1975). *Bumblebees*. David Poynter, London, 352 pp.

Aloni, B., Pashkar, T. y Karni, L. (1991). Effect of heat stress on the growth, root sugars, acid invertase and protein profile of pepper seedlings following transplantation. *Journal of Horticultural Science*, 67: 717-25.

Aloni, B., Karni, L., Zaidman, Z., Riov, Y., Buberman, M. y Goren, R. (1994). The susceptibility of pepper (*Capsicum annuum*, L.) to heat induced flower abscission: possible involvement of ethylene. *Journal of Horticultural Science*, 69: 923-928.

Aloni, B., Karni, L. y Ryalski, I. (1995). Inhibition of heat induced pepper (*Capsicum annuum*, L.) flower abscission and induction of fruit malformation by silver thiosulphate. *Journal of Horticultural Science*, 70: 215-220.

Aloni, B., Pressman, E. y Karni, L. (1999). The effect of fruit load, defoliation and night temperature on the morphology of pepper flowers and on fruit shape. *Annals of Botany*, 83 (5): 529-534.

Aparicio, V., Rodríguez, M. y Manzanares, C. (2003). Producción integrada en cultivos hortícolas bajo abrigo: Andalucía. En: Camacho, F. (ed.) *Técnicas de producción en cultivos protegidos*. Cajamar, Almería, 225-243.

Ashman T.L., Knight, T.M., Steets, J.A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell D.R., Dudash M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Morgan, M.T. y Wilson, W.G. (2004). Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85 (9): 2408-2421.

Baker, H.G. y Baker, I. (1983a). Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. En: Jones, C.E. y Little, R.J. (eds.). *Handbook of experimental pollination biology*. Scientific and Academic Editions, New York, 117-141.

Baker, H.G. y Baker, I. (1983b). A brief historical review of the chemistry of floral nectar. En: Bentley, B. y Elias, T.S. (eds.). *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, 126-152.

Baker, H.G. y Baker, I. (1990). The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany*, 39: 157-166.

Barrett, S.C.H. (1988). The evolution maintenance and loss of self-incompatibility systems. En: Lovett Doust, J. y Lovett Doust, L. (eds.). *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*. Oxford University Press, New York, 98-124.

Barrett, S.C.H. (2002). Sexual interferences in the floral kinds. *Heredity*, 88: 154-159.

Beltrán, F.D., Parra, A., Roldán, A., Soler, A. y Vila, E. (2010). Pasado, presente y futuro del control integrado de plagas en la provincia de Almería. En: *Perspectivas del Control Biológico en Agricultura bajo plástico. Cuadernos de Estudios Agroalimentarios (CEA)*, vol. 1. Fundación Cajamar, Almería, 27-43.

Benton, T. (2006). *Bumblebees*. Collins, London, 580 pp.

Berland, L. (1976). Atlas des Hyménoptères de France. En: *Atlas D 'Entomologie*, vol. 1. Société Nouvelle des Éditions Boubée, Paris, 157 pp.

Bernardello, G. (2007). A systematic survey of floral nectaries. En: Nicolson, S.W., Nepi, M. y Pacini, E. (eds.). *Nectaries and Nectar*. Springer, Netherlands, 19-128.

Bertin, R.I. y Newman, C.M. (1993). Dichogamy in Angiospermes. *The Botanical Review*, 59 (2): 113-151.

Blarer, A., Keasar, T. y Shmida, A. (2002). Possible mechanisms for the formation of flower size preferences by foraging bumblebees. *Ethology*, 108: 341-351.

Bosh, J. (2005). The contribution of solitary bees to crop pollination: from ecosystem service to pollinator management. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 151-65.

Brian, A.D. (1957). Differences in the flowers visited by four species of bumble-bees and their causes. *Journal of Animal Ecology*, 21: 223-240.

Brian, M.V. (1983). *Social Insects: Ecology and behavioural biology*. Chapman y Hall, London, 377 pp.

Briscoe, A.D. y Chittka, L. (2001). The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology*, 46: 471–510.

Buchmann, S.L. (1983). Buzz pollination in angiosperms. En: Jones, C.E. y Little, R.J. (eds.). *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Van Nostrand Reinhold, New York, 73–116.

Cabello, T., Van der Blom, J., Soler, A. y López, J.C. (2006). Visual attractants of flowers on horticulture plants. En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *Second Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 49-59.

Cabrera, A. y Uclés, D. (2011). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería, campaña 2010/2011. *Informes y Monografías* (35). Fundación Cajamar, Almería, 89 pp.

Cantliffe, D.J. y Vansickle, J.J. (2003). Competitiveness of the Spanish and Dutch greenhouse industries with the Florida fresh vegetable industry. *Document HS918*. EDIS, Florida. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu/cv284>.

Cardale, J.C. (1993). Hymenoptera: Apoidea. En: Houston, W.W.K. y Maynard, G.V. (eds.). *Zoological catalogue of Australia*, 10. Australian Government Printing Service, Canberra, 406 pp.

Castilla, N. (1994). Greenhouses in the Mediterranean areas: technological level and strategic management. *Acta Horticulturae*, 361: 44-56.

Castilla, N. (2005). *Invernaderos de plástico. Tecnología y manejo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México, 462 pp.

Castilla, N. y Hernández, J. (2005). The plastic greenhouse industry of Spain. *Chronica Horticulturae*, 45 (3): 15-20.

Ceballos, G. (1956). *Catálogo de los himenópteros de España*. CSIC, Madrid, 554 pp.

Céspedes, A.J., García, M.C., Pérez, J.J. y Cuadrado, I.M. (2009). *Caracterización de la explotación hortícola protegida de Almería*. FIAPA, Almería, 177 pp.

Chittka, L. y Menzel, R. (1992). The evolutionary adaptation of flower colours and the insect pollinator' colour vision. *Journal of Comparative Physiology A*, 171: 171-181.

Chittka, L., Sumida, A., Troje, N. y Menzel, R. (1994). Ultraviolet as a component of flower reflections, and the color perception of Hymenoptera. *Vision Research*, 34 (1): 1489-1508.

Chittka, L., Ings, E.Th.C. y Raine, E.N.E. (2004). Chance and adaptation in the evolution of island bumblebee behaviour. *Population Ecology*, 46: 243-251.

Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente, Junta de Andalucía (2012). *Avance de la campaña agrícola de Almería 2011-2012*. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.30d4b35a97db5c61716f2b105510e1ca/?vgnextoid=927e507f1e2c8310VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=81c4caa452318310VgnVCM1000001325e50aRCRD&lr=lang_es.

Corbet, S.A., Chapman, H. y Saville, N. (1988). Vibratory pollen collection and flower form: bumble-bees on *Actinidia*, *Symphytum*, *Borago* and *Polygonatum*. *Functional Ecology*, 2 (2): 147-155.

Corbet, S.A., Williams, I.H. y Osborne, J.L. (1991). Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European community. *Bee World*, 72 (2): 47-59.

Cruz, D.O., Freitas, B.M., da Silva, L.A., da Silva, E.M.S. y Bomfim, I.G.A. (2005). Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (12): 1197-1201.

Cuevas, J. y Pinillos, V. (2005). Assisted pollination. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 137-149.

Dag, A. y Kammer, Y. (2001). Comparison between the effectiveness of honey bee (*Apis mellifera*) and bumble bee (*Bombus terrestris*) as pollinators of greenhouse sweet pepper (*Capsicum annuum*). *American Bee Journal*, 141 (6): 447-448.

Dalla Torre, K.W. von (1882). Bemerkungen zur Gattung *Bombus* Latr., II. *Bericht des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck*, 12: 14-31.

Darwin, C.R. (1862). *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing*. John Murray, London, 365 pp.

Dellaporta, S.L. y Calderón-Urrea, A. (1993). Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell*, 5 (10): 1241-1251.

De Ruijter, A., van den Eijnde, J. y van der Steen, J. (1991). Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) in greenhouses by honeybees. *Acta Horticulturae*, 288: 270-274.

Dobson, H.E.M. (1994). Floral volatiles in insect biology. En: Bernays, E.A. (ed.). *Insect-plant interactions*, 5. CRC Press, Boca Raton, Florida, 47-81.

Dobson, H.E.M. (2005). Pollen odor and its effect on flower visitation by bees. En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 71-76.

Dobson, H.E.M. y Bergström, G. (2000). The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematic and Evolution*, 222: 63-87.

Dobson, H.E.M., Danielson, E.M. y van Wesep, I. (1999). Pollen odor chemicals as modulators of bumble bee foraging on *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae). *Plant Species Biology*, 14: 153-166.

Dötterl, S. (2006). Floral scent as attractant for moths and bees. En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *Second Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 77-91

Dornhaus, A. y Chittka, L. (1999). Insect behaviour-evolutionary origins of bee dances. *Nature*, 401: 38.

Dornhaus, A., Brockman, A. y Chittka, L. (2003). Bumblebees alert to food with pheromone from tergal gland. *Journal of Comparative Physiology A*, 189: 47-51.

Erlandsson, A. (1979). *Bombus canariensis* Pérez, 1895 n. stat and *Bombus maderensis* n. sp. from the Macaronesian Islands. *Entomologica Scandinavica*, 10: 187-192.

Estay, P., Wagner, A. y Escaff, M. (2001). Evaluation of *Bombus dahlbomii* (Guér.) as a pollinating agent for tomato *Lycopersicon esculentum* (Mill.) flowers under greenhouse conditions. *Agricultura Técnica* (online), 61 (2): 113-119. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072001000200001&lng=es&nrm=iso>.

Estoup, A., Slignac, M., Cornuet, J.M., Goudet, J. y Scholl, A. (1996). Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology*, 5: 19-31.

Fahn, A. (2000). Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*, 31: 37-75.

FAO (2002). El cultivo protegido en clima mediterráneo. *Cuadernos técnicos de la FAO. Estudios FAO: Producción y Protección Vegetal*, 90. FAO, Roma, 324 pp.

FAO (2008). *Rapid assessment of pollinators' status: A contribution to the international initiative conservation and sustainable use of pollinators*. FAO, Rome, 124 pp.

FAOSTAT (2012). <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

Fenster Ch.B., Armbruster W.S., Wilson, P., Dudash M.R. y Thomson, J.D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 35: 375-403.

Franklin, H.J. (1913). The *Bombidae* of the New World. *Transactions of the American Entomological Society*, 38: 177-486.

Free, J.B. (1963). The flower constancy of honeybees. *Journal of Animal Ecology*, 32 (1): 119-131.

Free, J.B. (1970). The flower constancy of bumblebees. *Journal of Animal Ecology*, 39 (2): 395-402.

Free, J.B. (1987). *Pheromones of social bees*. Cornell University Press, New York, 344 pp.

Free, J.B. (1993). *Insect pollination of crops*, Academic Press, London, 684 pp.

Free, J.B., Ferguson, A.W., Pickett, J.A. y Williams, I.H. (1982). Use of unpurified Nasanov pheromone components to attract clustering honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 21: 26-29.

Galliot, C., Stuurman, J. y Kuhlemeier, Cr. (2006). The genetic dissection of floral pollination syndromes. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 78-82.

Galetto, L. y Bernardello, G. (2003). Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? *Plant Systematic and Evolution*, 238: 69-86.

González, M.V., Coque, M. y Herrero, M. (1998). Influence of pollination systems on fruit set and fruit quality in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Annals of Applied Biology*, 132: 349-355.

Goulson, D., Stout, J.C. y Hawson, S.A. (1997). Can flower constancy in nectaring butterflies be explained by Darwin's interference hypothesis? *Oecologia*, 112: 225-231.

Goulson, D. (2003). *Bumblebees, their behaviour and ecology*. Oxford University Press, New York, 235 pp.

Goulson, D. (2010). *Bumblebees, behaviour, ecology and conservation*. Oxford University Press, Oxford, 317 pp.

Graystock, P., Yates, K., Evison, S.E.F., Darvill, B., Goulson, D. and Hughes, W.O.H. (2013). The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology*, 50 (5): 1207–1215.

Griffin, R.P., Macfarlane, R.P., van der Ende, H.J. (1991). Rearing and domestication of long tongued bumblebees in New Zealand. *Acta Horticulturae*, 288: 149-153.

Guerra-Sanz, J.M. y Roldán-Serrano, A. (2004). Activity of Bumblebees (*Bombus terrestris*, L.) on the pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) flowers and fruit set. En: *17th International Pepper Conference*, Naples, Florida, 23.

Guerra-Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A.S. y Mena-Granero, A. (2004). Pollination of zucchini culture by bumblebees: Advance of results of quality production. En: Lebeda, A. y Paris, H.S. (eds.). *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Olumouc (República Checa), 75-77.

Guerra-Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A.S. y Mena-Granero, A. y Fernández-López, C. (2005). Pollination in extra-early horticultural crops of Almería greenhouses framework. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 97-112.

Gurr, L. (1957). Bumble bee species present in the South Island of New Zealand. *New Zealand Journal of Science and Technology*, A38 (9): 997-1001.

Harder, L.D. y Barclay, R.M.R. (1994). The functional significance of poricidal anthers and buzz pollination: controlled pollen removal from *Dodecatheon*. *Functional Ecology*, 8: 509–517.

Harris, M. (1776). *An exposition of English insects, with curious observations and remarks, wherein each insect is particularly described; its parts and properties considered; the different sexes distinguished, and the natural history faithfully related*. Messrs. Robson and Co., and Dilly, London, 166 pp.

Heinrich, B. (1976). Foraging specializations of individual bumblebees. *Ecological Monographs*, 46: 129-133.

Heinrich, B. (1979). *Bumblebee economics*. Harvard University Press, London, 247 pp.

Heinrich, B. (1993). *The hot blooded insect*. Springer-Verlag, New York, 601 pp.

Henning, J.A., Peng, Y.S., Montague, M.A. y Teuber, L.R. (1990). Honey bee (Hymenoptera: Apidae) behavioural response to primary alfalfa (*Rosales fabaceae*) floral volatiles. *Journal of Economical Entomology*, 85: 233-239.

Herrera, C. (2009). Evolución de las relaciones entre plantas y polinizadores: logros y deficiencias de la agenda darwiniana. *Memorias de la Real Academia Servillana de Ciencias*, 9: 159-174.

Heslop-Harrison, J. (1975). Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annual Review of Plant Physiology*, 26: 403-425.

Holcroft, D.M. y Allan, P. (1994). Applied research note: artificial pollination of kiwifruit. *Journal of Southern African Society for Horticultural Sciences*, 4 (2): 24-26.

Huffaker, C.B. y Rabb, R.L. (1984). *Ecological Entomology*. Wiley Interscience, New York, 756 pp.

Inoue, M.N., Yokoyama, J. y Washitani, I. (2008). Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation*, 12: 135-146.

Ish-Am, G., Regev, Y., Peterman, Y., Lahav, E., Degani, Ch., Elbatzri, R. y Gazit, Sh. (1998). Improving avocado pollination with bumblebees: 3 seasons summary. *California Avocado Society Yearbook*, 82: 119-135.

Iwahori, S. (1965). High temperature injuries in tomato. IV. Development of normal flower buds and morphological abnormalities of flower buds treated with high temperature. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 34 (1): 33-41.

Janick, J. (1972). *Horticultural Science*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 586 pp.

Jarlan, A., De Oliveira, D. y Gingras, J. (1997a). Pollination by *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) and seed set of greenhouse sweet pepper. *Journal of Economical Entomology*, 90: 1646-1649.

Jarlan, A., De Oliveira, D. y Gingras, J. (1997b). Effects of *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) pollination on characteristics of greenhouse sweet pepper fruits. *Journal of Economical Entomology*, 90: 1650-1654.

Jarlan, A., De Oliveira, D. y Gingras, J. (1997c). Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in green-house by the syrphid fly *Eristalis tenax* (L.). *Acta Horticulturae*, 437: 335.

Kaftanoglu, (2000). Diversity faunistic bumblebees for greenhouses compact. En: *Proceedings of the specialists' meeting Insect pollination in greenhouses*, Soesterberg, 73-81.

Kearns, C.A. y Inouye, D.W. (1997). Pollinators, flowering plants and biology conservation. Much remains to be learned about pollinators and plants. *BioSciences*, 47 (5): 297-307.

Kevan, P.G. (1999). Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Plant Systematic and Evolution*, 74: 373-393.

Kevan, P.G. (2003). The modern science of ambrosiology: in honour of Herbert and Irene Baker. *Plant Systematic and Evolution*, 238: 1-5.

Khah, E.M. y Passam, H.C. (1992). Flowering, fruit set and development of the fruit and seed of sweet pepper (*Capsicum annuum*, L.) cultivated under conditions of high ambient temperature. *Journal of Horticultural Science*, 67: 251-258.

Kirk, W.D.J. (2004). Plants for bees. Faba bean: *Vicia faba*. *Bee World*, 85 (3): 60-62.

Kirk, W.D.J (2005). Pollen collection by honey bees. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 7-18.

Klein, A.M., Vaissie`re, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C. and Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceeding of the Royal Society Biological Sciences*, 274: 303-313.

Kriechbaumer, J. (1870). Vier neue Hummelarten. *Verhandlungen der Zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien*, 20: 157-160.

Kristjansson, K. y Rasmussen, K. (1991). Pollination of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) with the solitary bee *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). *Acta Horticulturae*, 288: 173-177.

Krombein, K.V., Hurd, P.D., Smith, D.R. and Burks, B.D. (1979). *Catalogue of Hymenoptera in America North of Mexico*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 1224 pp.

Krüger, E. (1920). Beiträge zur Systematik und Morphologie der mittel-europäischen Hummeln. *Zoologische Jahrbücher* (Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere), 42: 289-464.

Krüger, E. (1956). Phaenoanalytische Studien an einigen Arten der Untergattung *Terrestribombus* O. Vogt (Hymenoptera, Bombidae). II. Teil. *Tijdschrift voor Entomologie*, 99: 75-105.

Kubisová, S. y Haslbachová, H. (1991). Pollination of male-sterile green pepper line (*Capsicum annuum* L.) by honeybees. *Acta Horticulturae*, 288: 364-367.

Kunze, J. y Gumbert, A. (2001). The combined effect of color and odor on flower choice behavior of bumble bees in flower mimicry systems. *Behavioral Ecology*, 12: 447-456.

Lama, R. y Poletti, M. (1993). Affidare al bombo l'impollinazione. *Culture Protette e ortoflorohutticultura intesia*, 1: 35-38.

Lammers, T.G. y Freeman, C.E. (1986). Ornithophily among the Hawaiian Lobelioideae (*Campanulaceae*): evidence from floral nectar sugar composition. *American Journal of Botany*, 73 (11): 1613-1619.

Latreille, P.A. (1802). *Histoire naturelle des fourmis, et recueil de mémoires et d'observations sur les abeilles, les araignées, les faucheurs, et autres insectes*. Paris, 445 pp.

Lawless, J. (2001). *The Aromatherapy Garden: growing and using scented plants*. Kyle Cathie Limited, London, 160 pp.

Lepeletier de Saint-Fargeau, A.L.M. (1832). Observations sur l'ouvrage intitulé: 'bombi scandinaviae monographice tractato, etc., à Gustav. Dahlbom.'. *Annales de la Société Entomologique de France*, 1: 366-382.

Linnaeus, C. (1758). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Laurentius Salvius, Holmiae (Stockholm), 823 pp.

Lloyd, D.G. y Webb, C.J. (1986). The avoidance of interferences between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24: 135-162.

López-Vaamonde, C. (2005). Review on conflict between queens and workers over reproduction in the bumblebee *Bombus terrestris*. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 123-136.

Loughrin, J.H., Hamilton-Kemp, T.R., Anderson, R.A. y Hildebrand, D.F. (1991). Circadian rhythm of volatile emission from flowers of *Nicotiana glauca* and *N. glauca*. *Physiologia Plantarum*, 83: 492-496.

Lurie, S., Shapiro, B. y Ben-Yehoshua, S. (1986). Effects of water stress and degree of ripeness on rate of senescence of harvested bell pepper fruit. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 111: 880-885.

Macfarlane, R.P., Griffin, R.P. y Read, P.E.C. (1983). Bumble bee management options to improve "grasslands pawera" red clover seed yields. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 44: 40-53.

Macfarlane, R.P. y Ferguson, A.M. (1983). Kiwifruit pollination: a survey of the insect pollinators in New Zealand. En: *Fifth International Symposium on Pollination*, Versailles, 367-373.

Macfarlane, R.P. y Gurr, L. (1995). Distribution of bumble bees in New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 18: 29-36.

Maciel Correia, M.L. (1991). Selection of pollinators from the Portuguese fauna of wild bees. *Acta Horticulturae*, 288: 69-73.

Magnan, A. (1934). *La locomotion chez le animaux I. Le vol des insects*. Herman y C^{ie}, Paris, 186 pp.

MAGRAMA (2011). *Avance Anuario de Estadística, 2011*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Medioambiente, Madrid, 983 pp.

Marcelis, L.F.M. y Baan Hofman-Eijer, L.R. (1997). Effects of seed number on competition and dominance among fruits in *Capsicum annuum*, L. *Annals of Botany*, 79 (6): 687-693.

Martin, J.A., Erwin, A.T. y Lounsberry, C.C. (1932). Nectaries of *Capsicum*. *Journal of Science*, 6: 277-285.

Masson, C., Pham-Delegue, M.H., Fonta, C., Gascuet, J., Arnold, G., Nicolas, G. y Kerzberg, M. (1993). Recent advances in the concept of adaptation to natural odour signals in honeybee *Apis mellifera*, L. *Apidologie*, 24: 169-194.

Matile, P. y Altenburger, R. (1988). Rhythms of fragrance emissions in flowers. *Planta*, 174: 242-247.

Matthews, R.W. y Matthews, J.R. (1978). *Insects behaviour*. Wiley Interscience, New York, 507 pp.

McGregor, S.E. (1976). *Insect Pollination of Cultivated Plants*. U.S.D.A. Agriculture Handbook N° 496, US Government Printing Office, Washington D.C., 849 pp.

McNeil, R. y Pidduck, W. (2003). The effectiveness of the western bumblebee in pollinating Hass avocado trees. *Proceedings of V World Avocado Congress*, 1: 253-256.

Meisels, S. y Chiasson, H. (1997). Effectiveness of *Bombus impatiens* Cr. as pollinators of greenhouse sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Acta Horticulturae*, 437: 425-429.

Meca-Abad, D.E. y Gázquez-Garrido, J.C. (2007a). Evaluación de una rotación de cultivos ecológicos en invernadero. En: *Memoria Anual 2007*. Fundación Cajamar, Almería, 131 pp.

Meca-Abad, D.E. y Gázquez-Garrido, J.C. (2007b). Polinizadores naturales (*Bombus terrestris*) vs bioestimulantes en calabacín en invernadero. Ciclo temprano de otoño. En: *Memoria Anual 2007*. Fundación Cajamar, Almería: 131 pp.

Mena-Granero, A., Egea-González, F.J., Garrido-Frenich, A., Guerra-Sanz, J.M. y Martínez-Vidal, J.L. (2004). Single step determination of fragrances in *Cucurbita* flowers by coupling headspace solid-phase microextraction low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1045 (1-2): 173-179.

Mena-Granero, A., Guerra-Sanz, J.M., Egea-González, F.J., Martínez-Vidal, J.L., Dornhaus, A., Ghani, J., Roldán-Serrano, A. y Chittka, L. (2005). Chemical compounds of the foraging recruitment pheromone in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 92: 371-374.

Mercado, J.A., Mercado, B., Viñegla, B. y Quesada, M.A. (1997a). Effects of hand-pollination, paclobutrazol treatments, roots temperature and genotype on pollen viability and seed fruit content of winter-grown pepper. *Journal of Horticultural Science*, 72 (6): 893-900.

Mercado, J.A., Mercado, B., Trigo, M. Mar, Reid, M.S., Valpuesta, V. y Quesada, M.A. (1997b). Effects of low temperature on pepper pollen morphology and fertility: Evidence of cold induced exine alterations. *Journal of Horticultural Science*, 72 (2): 317-326.

Molina, J. y Marzo, B. (2010). El aumento de la competencia obliga a la agricultura intensiva almeriense a reinventarse. *Vida Rural*, 319. Disponible en: <http://www.vidarural.es/articulos-aumento-competencia-obliga-agriculturaintensiva-almeriense-reinventarse/1/1479.html>

Monzón, V.H., Bosch, J. y Retana, J. (2004). Foraging behaviour and pollinating effectiveness of *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) on "Comice" pear. *Apidologie*, 35: 575-585.

Morandin, L.A., Lavery, T.M. y Kevan, P.G. (2001). Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and pollination levels on commercial tomato greenhouses. *Journal of Economic Entomology*, 94 (2): 462-467.

Morgan, M.T. y Wilson, W.G. (2004). Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85: 2408-2421.

Morse, A.R. y Calderone, N.W. (2000). The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Culture Magazine*. Cornell University, New York, 16 pp.

Morse, A., Kevan, P., Shipp, L., Khosla, Sh. y McGarvey, B. (2012). The impact of greenhouse tomato (Solanales: Solanaceae) floral volatiles on bumblebee (Hymenoptera: Apidae) pollination. *Environmental Entomology*, 41 (4):855-864.

Navarro-Castillo, J.A. (1993). *Polinización mediante abejorros: aplicación en campo*. Proyecto Fin de Carrera, Universidad de Almería.

Navarro-Castillo, J.A. (2002). *25 años de Avance agrícola*. Colegio Oficial de ITA de Almería, Almería, 173 pp.

Navez, B. (1989). La pollinisation des tomates de serre par le bourdons, l'expérience Belge. *Infos-CTIFL*, 55: 25-26.

Navez, B. y Budin, P. (1990). Pollinisation des tomates soies serre en Provence. *P.H.M.-Revue-Horticole*, 310: 29-33.

Nepi, M. y Paccini, E. (1993). Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany*, 72 (6): 527-536.

Nepi, M., Pacini, E. y Willemse, M.T.M. (1996). Nectary biology of *Cucurbita pepo*: ecophysiological aspects. *Acta Botanica Neerlandica*, 45 (1): 41-54.

Nepi, M., Guarnieri, M. y Pacini, E. (2001). Nectar secretion, reabsorption and sugar composition in male and female flowers of *Cucurbita pepo*. *International Journal of Plant Sciences*, 162: 353-358.

Nepi, M. (2005). Physiological and ecological aspects of pollination in *Cucurbita pepo* L. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 57-70.

NeSmith, D.S., Heogenboom, G. y Groff, D.W. (1994). Staminate and pistillate flower production of summer squash in response to planting date. *HortScience*, 29: 256-257.

Nuez, F., Gil-Ortega, R. y Costa, J. (1996). *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México, 607 pp.

Odland, M.L. y Porter, A.M. (1941). Study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). *Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences*, 38: 585-588.

Ornosa, C. (1986a). Revisión de los Bombinae estudiados por D. Modesto Quilis (Hym., Apidae). *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 10: 359-368.

Ornosa, C. (1986b). Especies de Bombinae de la Sierra de los Ancares (Hymenoptera: Apidae). En: *Actas de las VIII Jornadas Asociación Española de Entomología*, Sevilla, 1042-1050.

Ornosa, C. (1991). Consideraciones taxonómicas sobre el subgénero *Megabombus* Dalla Torre, 1880, en la Península Ibérica (Hym., Apidae, Bombinae). *Anales de Biología*, 17: 33-41.

O'Toole, C. y Raw, A. (1991). *Bees of the world*. Blandford, London, 191pp.

Pacini, E., Nepi, M. y Vesprini, J.L. (2003). Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematic and Evolution*, 238: 7-21.

Pesson, P. y Louveaux, J. (1984). *Pollinisation et Production végétales*. INRA, París, 630 pp.

Pérez, J. (1895). Voyage de M. Ch. Alluaud aus îles Canaries (Novembre 1889-Juin 1890), 4e mémoire (1). Hyménoptères. *Annales de la Société entomologique de France*, 64: 191-201.

Pham-Delegue, M.H.P., Etievant, E., Guichard, E. y Masson, C. (1989). Sunflower volatiles involved in honeybee discrimination among genotypes and flowering stages. *Journal of Chemical Ecology*, 15: 329-343.

Pham-Delegue, M.H.P., Etievant, E., Guichard, R., Marilleau, P., Duault, Chauffaille, J. y Masson, C. (1990). Chemicals involved in honey-bee-sunflower relationship. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 3053-3065.

Picken, A.J.F. (1984). A review of pollination and fruit set in the tomato. *Journal of Horticultural Science*, 59: 1-13.

Pinillos, V. y Cuevas, J. (2008). Artificial pollination in tree crop production. *Horticultural Reviews*, 34: 239-271.

Pitts-Singer, T.L. y Bosch, J. (2010). Nest establishment, pollination efficiency, and reproductive success of *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae) in relation to resource availability in field enclosures. *Environmental Entomology*, 39: 149-158.

Polowick, P.L. y Sawhney, V.K. (1985). Temperature effects on male fertility and flower and fruit development in *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae*, 25: 117-127.

Porporato, M., Pinna, M., Manino, A. y Marletto, F. (1995). *Bombus terrestris* (L.) e *Apis mellifera* (L.) nell'impollinazione del peperone in coltura protetta. *Apicoltore Moderno*, 86: 99-112.

Pouvreau, A. (1984). Quelques production potagere: tomate et autres solanées, melon et autres cucurbitacées. En: Pesson, P. y Louveaux, J. (eds.). *Pollinisation et productions végétales*. INRA, Paris, 663 pp.

Pouvreau, A. (1989). Contribution à l'étude du polyéthisme chez les bourdons, *Bombus* Latr. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 20: 229-244.

Pressman, E., Moshkovitch, H., Rosenfeld, K., Shaked, R., Gamleil, B. y Aloni, B. (1998a). Influence of low night temperatures on sweet pepper flower quality and the effect of repeated pollinations, with viable pollen, on fruit setting. *Journal of Horticultural Science y Biotechnology*, 73: 131-136.

Pressman, E., Tomer, E., Cohen, M., Rosenfeld, K., Shaked, R., Moshkovitch, H. y Aloni, B. (1998b). Histological examination of low temperature or TIBA-induced swelling of pepper ovaries. *Plant Growth Regulation*, 25: 171-175.

Pressman, E., Peet, M.M. y Pharr, D. (2002). The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany*, 90 (5): 631-663.

Prys-Jones, O.E. (1982). *Ecological studies of foraging and life history in bumblebees*. Ph. D. Thesis, University of Cambridge.

Prys-Jones, O.E. y Corbet, S.A. (1987). *Bumblebees*. Cambridge University Press, Cambridge, 86 pp.

Prys-Jones, O.E. y Corbet, S.A. (1991). *Bumblebees*. Richmond Publishing Co. Ltd. Slough (England), 92 pp.

Rabinowitch, H.D., Fahn, A., Meir, T. y Lensky, Y. (1993). Flower and nectar attributes of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants in relation to their attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Annals Applied Biology*, 123: 221-232.

Raguso, R. A. (2005). Olfactory signals in pollination biology. En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 48-56 pp.

Raw, A. (2000). Foraging behaviour of wild bees at hot pepper flowers (*Capsicum annuum*) and its possible influence on cross pollination. *Annals of Botany*, 85 (4): 487-492.

Reglamento (CE) N° 1455/1999 de la Comisión, de 1 de julio de 1999. Norma de comercialización de los pimientos dulces. *Diario Oficial de las Comunidades europeas* L167/22-25.

Richards, O.W. y Davies, R.G. (1984). *Tratado de Entomología Imms* vol. 2: *clasificación y biología*. Omega, Barcelona, 1008 pp.

Robinson, W.S., Nowogrodzki, R. y Morse, R.A. (1989a). The value of bees as pollinators of U.S. crops. *American Bee Journal*, 129 (6): 411-423.

Robinson, W.S., Nowogrodzki, R. y Morse, R.A. (1989b). The value of bees as pollinators of U.S. crops. *American Bee Journal*, 129 (7): 477-487.

Robinson, R.W. y Reiners, S. (1999). Parthenocarpy in summer squash. *HortScience*, 34: 715-717.

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2003). Efecto de la polinización con abejorros (*Bombus terrestris*, L.), en invernadero, sobre la calidad de pimiento (*Capsicum annuum*, L.) tipo California. *Actas de Horticultura*, 39: 425-427.

Roldán-Serrano, A. y Guerra-Sanz, J.M. (2004). Polinización de pimiento “California” en invernadero. *Revista Horticultura*, 177: 74-75.

Roldán-Serrano, A.S., Ortuño-Izquierdo M.J. y Guerra-Sanz, J.M. (2002a). Pollination of *Capsicum annuum* (L.) (sweet pepper) flowers by bumblebee visits during autumn-winter crop under greenhouse conditions. En: *Floral Scent, Biology, Chemistry and Evolution of 2nd Gordon Research Conferences*, Ventura, California, 4.

Roldán-Serrano, A.S., Ortuño-Izquierdo M.J. y Guerra-Sanz, J.M. (2002b). Flower attractiveness to bumblebees (*Bombus terrestris*, L.) in zucchini (*Curcubita pepo*, L.). *Proceeding of Cucurbitaceae 2002*. Naples, Florida 343-348.

Roldán-Serrano, A., Guerra-Sanz, J.M., Mena-Granero, A., Egea-González, F.J., Martínez-Vidal, J.L. (2005). Are the bumblebees able to choose nutritive pollen? En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 113-121.

Roldán, A., Sacot, P., Parra, A., Ruíz, L. y Funes, S. (2011). Polinización con abejorros en calabacín: una alternativa a las fitohormonas. En:

Libro de Resúmenes del VII Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Joxman Editores, Baeza, 106.

Rundlöf, M. y Smith, H. (2011). *Status and Trends of European Pollinators (STEP Project)*, Universidad de Lund, 22 pp.

Rylski, I. (1985). Capsicum. En: Halevy, H.A. (ed.). *Handbook of Flowering*, vol. 2. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 140-146.

Rylski, I. (1986). Peppers (*Capsicum*). En: Monselise, S.P. (ed.). *Handbook of fruit set and development*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 341-354.

Rylski, I. y Aloni, B. (1991). Parthenocarpic fruit set and development in Cucurbitaceae and Solanaceae under protected cultivation in mild winter climate. *Acta Horticulturae*, 287: 117-126.

Rylski, I. y Spigelman, M. (1986a). Effect of shading on plant development, yield and fruit quality of sweet pepper grown under conditions of high temperature and radiation. *Scientia Horticulturae*, 29: 31-35.

Rylski, I. y Spigelman, M. (1986b). Use of shading to control the time of harvest of red-ripe pepper fruits during the winter season in a high-radiation desert climate. *Scientia Horticulturae*, 29: 37-45.

Sawhney, V.K. (1984). Gibberellins and fruit formation in tomato: a review. *Scientia Horticulturae*, 22: 1-8.

Schmiedeknecht, H.L.O. (1878). Monographie der in Thüringen vorkommenden Arten der Hymenopteren-Gattung *Bombus* mit einer allgemeinen Einleitung in dieses Genus. *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft*, 12: 303-430.

Sedgley, M. (1990). Flowering of deciduous perennial fruit crops. *Horticultural Review*, 12: 223-264.

Sedgley, M. y Griffin, A.R. (1989). *Sexual Reproduction of Tree Crops*. Academic Press Limited, London, 378 pp.

Shipp, J.L., Whitfield, G.H. y Papadopoulos, A.P. (1994). Effectiveness of the bumble bee, *Bombus impatiens* Cr. (Hymenoptera: Apidae), as a pollinator of greenhouse sweet pepper. *Scientia Horticulturae*, 57: 29-39.

Shivanna, K.R. y Sawhney, V.K. (1997). *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, 468 pp.

Shupp, J.R., Koller, S.I. y Hosmer, W.D. (1997). Testing a power duster for pollination of 'McIntosh' apples. *HortScience*, 32 (4): 742.

Sladen, F.W.L. (1912). *The Humble bee, its life history and how to domesticate it, with descriptions of all the British species of "Bombus" and "Psithyrus"*. Logaston Press, London, 273 pp.

Solé J., Massana, J. & Recasens, I. (2000). Ensayo de polinización controlada en manzanos. *Fruticultura Profesional*, 110: 31-36.

Spaethe, J. y Briscoe, Ad. (2005). Molecular characterization and expression of the UV opsin in bumblebees: three ommatidial subtypes in the retina and a new photoreceptor organ in the lamina. *Journal of Experimental Biology*, 208: 2347-2361.

Stapleton, S.C., Wien, H.C. y Morse, R.A. (2000). Flowering and fruit set of pumpkin cultivars under field conditions. *HortScience*, 35: 1074-1077.

Stout, J.C. y Goulson, D. (2000). Bumblebees in Tasmania: their distribution and potential impact on Australian flora and fauna. *Bee World*, 81: 80-86.

Syafaruddin, Horisaki, A., Niikura, S, Yoshioka, Y. y Ohsawa, R. (2006). Effect of floral morphology on pollination in *Brassica rapa*, L. *Euphytica*, 149 (3): 267-272.

Thomson, J.D. y Goodell, K. (2001). Pollen removal and deposition by honeybee and bumblebee visitors to apple and almond flowers. *Journal of Applied Ecology*, 38 (5): 1032-1044.

Thompson, H.C. y Kelly, W.C. (1957). *Vegetable Crops*. McGraw-Hill, New York-Toronto-London, 611 pp.

Thorp, R.W. (2003). Bumble bees (Hymenoptera: Apidae): commercial use and environmental concerns. En: *For non-native crops, whence pollinators of the future?* Proceedings of the Entomological Society of America. Lanham, Md.: Thomas Say Publications in Entomology, 21-40.

Torres, C., Mimosa, M. y Galetto, L. (2013). Nectar ecology of *Datura ferox* (Solanaceae): an invasive weed with nocturnal flowers in agro-ecosystems from central Argentina. *Plant Systematic and Evolution*, 299: 1433-1441.

Torreta, J.P., Medan, D. y Abrahamovich, A.H. (2006). First record of the invasive bumblebee *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in Argentina. *Transactions of the American Entomological Society*, 132: 285-289.

Tournier, H. (1890). Description d'espèces nouvelles. *L'Entomologiste Genèveois*, 1 (11-12): 220-223.

Traveset, A. (1999). Ecology of plant reproduction: mating systems and pollination. En: Pugnaire, F.I. y Valladares, F. (eds.) *Handbook of Functional Plant Ecology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 920 pp.

Varela, F. (1974). *Los ojos de los insectos*. Alambra, Madrid, 108 pp.

Velthuis, H.H.W. y van Doorn, A. (2006). A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37: 421-451.

Van der Eijnde, J., de Ruijter, A. y van der Steen, J. (1991). Method for rearing *Bombus terrestris* continuously and the production of bumblebee colonies for pollination purposes. *Acta Horticulturae*, 288: 154-158.

Van der Ravestijn, W. y van der Sande, J. (1991). Use of bumblebees for the pollination of glasshouse tomatoes. *Acta Horticulturae*, 288: 204-212.

Vogt, O. (1911). Studien über das Artproblem. 2. Mitteilung. Über das Variieren der Hummeln. 2. Teil. (Schluss). *Sitzungsberichte der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin*, Berlin, 31-74.

Webb, C.J. y Lloyd, D.G. (1986). The avoidance of interferences between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24: 163-178.

Webster, B.D., Ross, D.M. y Evans, T. (1982). Nectar and the nectary of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107: 497-503.

Weiss, M. (2001). Vision and learning in some neglected pollinators: beetles, flies, moths, and butterflies. En: Chittka, L. y Thomson, J.D. (eds.). *Cognitive ecology of pollination: animal behaviour and floral evolution*. Cambridge University Press, New York, 171-190.

Williams, P.H. (1998). An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bulletin of the Natural History Museum (Entomology)*, 67: 79-152.

Winter, K., Adams, L., Thorp, R.W., Inouye, D.W., Day, L., Ascher, J. y Buchmann, S. (2006). Importation of non-native bumble bees into North America: potential consequences of using *Bombus terrestris* and other non-native bumblebees for greenhouse crop pollination in Canada, Mexico, and the United States. *A White Paper of the North American Pollinator Protection Campaign (NAPCC)*, 33 pp.

Referencias páginas web

<http://www.blogspot.com>

<http://www.bridgerlandaudubon.org>

<http://www.discoverlife.org>

<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/bombus/genitalia.html>.

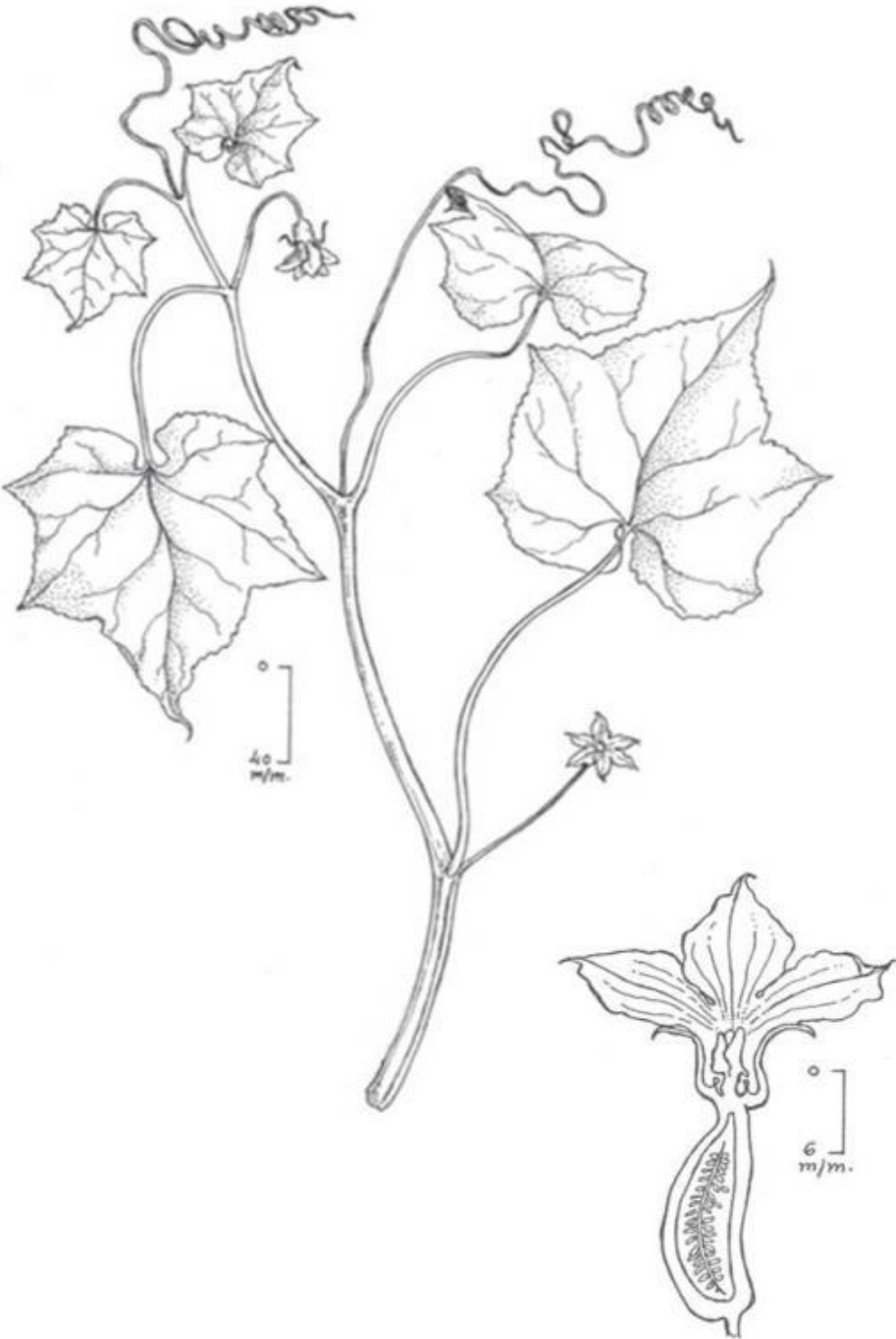
Copyright 2007.

<http://www.nhm.ac.uk/researchcuration/projects/bombus/introduction.html>
Copyright 2007.

<http://www.nhm.ac.uk.research-curation/research/projects/bombus/bo.html>
Copyright 2013.

http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=11761&page=131 **Capítulo 5 de *Status of Pollinators in North America*, (2007).** The National Academies Press, Washington, D.C., 312 pp.

ANEXO



Cuadro 1. Superficie cultivada (ha), rendimiento (hg / ha) y producción (t) de hortalizas frescas, incluido melón, en Europa. Año 2010 (FAOSTAT, 2012).

Países	Superficie cultivada (ha)	Rendimiento (hg/ha)	Producción (t)
Italia	536.799	264.555	14.201.277
España	340.600	372.454	12.685.800
Polonia	205.412	253.309	5.203.263
Holanda	87.709	545.739	4.786.618
Francia	234.050	211.589	4.952.241
Rumania	262.257	147.341	3.864.117
Grecia	117.500	287.336	3.376.200
Alemania	107.511	311.661	3.350.699
Portugal	85.280	331.918	2.830.600
Reino Unido	114.161	234.659	2.678.889
Bélgica	60.502	329.821	1.995.485
Hungría	67.385	169.865	1.144.633
Austria	15.121	391.065	591.330
Bulgaria	30.401	167.685	509.778
Dinamarca	10.132	302.084	306.072
Suecia	23.280	128.308	298.700
Eslovaquia	28.974	94.694	274.366
Finlandia	9.060	268.328	243.105
Lituania	15.815	142.744	225.749
Irlanda	5.590	398.766	222.910
República Checa	8.713	170.620	148.661
Letonia	8.396	180.027	151.151
Malta	5.410	153.606	83.101
Estonia	3.042	243.258	73.999
Eslovenia	2.800	217.082	60.783
Luxemburgo	20	487.500	975
UE-27	2.385.920	6.806.014	64.260.502
Federación Rusa	759.100	174.990	13.283.490
Ucrania	551.030	161.717	8.911.100
Bielorrusia	81.612	286.947	2.341.830
Serbia	153.637	86.379	1.327.106
Albania	36.064	237.093	855.053
Bosnia Herzegovina	124.663	59.233	738.418
Macedonia	47.108	161.161	759.196
República de Moldavia	49.550	89.786	444.889
Suiza	14.934	244.032	364.437
Croacia	11.774	185.882	218.858
Noruega	5.956	252.252	150.241
Montenegro	6.778	214.212	145.193
Islandia	66	727.576	4.802
Resto de países europeos	1.842.272	2.881.260	29.544.613

Cuadro 2. Superficie (ha), rendimiento (kg / ha) y producción (t) de hortalizas, según tipo y forma de cultivo en España. Año 2010 (MAGRAMA, 2011).

Cultivos	Superficie (ha)			Rendimiento (kg/ha)				Producción (t)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
DE HOJA O TALLO:								
Col-repollo de hojas lisas	--	--	--	3.008	--	--	--	112.708
Col-repollo de hojas rizadas o de Milán	--	--	--	1.987	--	--	--	80.922
	--	--	--	83	--	--	--	1.972
Col de Bruselas	--	--	--	2.352	--	--	--	41.958
Otras coles	861	6.569	--	7.430	40.766	30.820	--	237.560
COL TOTAL	388	251	--	639	32.758	28.756	--	19.931
BERZA	2.358	7.331	489	10.178	3.414	5.422	5.234	50.362
ESPARRAGO	1	1.461	--	1.462	14.000	50.582	--	73.915
APIO	--	--	--	7.707	--	--	--	225.829
Lechuga romana	--	--	--	23.549	--	--	--	583.561
Lechuga acogollada	198	30.174	884	31.256	16.891	25.792	31.435	809.390
LECHUGA TOTAL	16	2.346	32	2.394	13.538	24.963	31.964	59.803
ESCAROLA	12	2.964	73	3.049	9.567	19.352	26.445	59.403
ESPINACA	52	2.063	72	2.187	14.324	26.015	69.015	59.386
ACELGA	3	551	--	554	9.000	31.425	--	17.345
CARDO	6.665	340	--	7.005	11.851	15.343	--	84.202
GRELO	--	--	12	12	--	--	8.500	102
CANÓNIGO	--	--	32	32	--	--	10.500	336
RÚCULA	--	115	5	120	--	20.578	39.700	2.565
ACHICORIA VERDE	--	407	1	408	--	22.843	9.000	9.306
ENDIVIA	--	293	12	305	--	36.913	70.000	11.656
BORRAJA								
DE FRUTO:								
SANDÍA	2.003	10.065	6.580	18.648	13.481	37.377	57.634	782.430
Melón de piel lisa	--	--	--	3.925	--	--	--	108.940
Melón tendral	--	--	--	1.546	--	--	--	28.980
Melón cantalupo	--	--	--	2.308	--	--	--	55.599
Otros melones	--	--	--	23.409	--	--	--	737.036
MELÓN TOTAL	1.873	21.982	6.746	30.601	5.692	31.050	34.611	926.693
CALABAZA	180	1.782	18	1.980	13.893	28.275	51.389	53.813
CALABACÍN	55	2.104	5.459	7.618	14.249	33.533	54.069	366.498
PEPINO	5	2.969	5.174	8.148	11.600	77.855	83.836	664.975
PEPINILLO	--	85	2	87	--	12.447	120.000	1.299
BERENJENA	10	1.367	2.061	3.438	8.850	28.539	73.311	190.195
Tomate, recolección 1-I a 31-V	--	--	--	10.692	--	--	--	944.056
Tomate, recolección 1-VI a 30-IX	--	--	--	41.137	--	--	--	2.818.392
Tomate, recolección 1-X a 31-XII	--	--	--	6.062	--	--	--	499.798
TOMATE TOTAL	385	41.070	17.812	59.267	15.642	65.450	90.874	4.312.709
PIIMIENTO	219	7.170	10.586	17.975	6.330	27.397	63.781	873.011
GUINDILLA	11	152	1	164	4.291	16.934	25.000	2.646
FRESA Y FRESÓN	83	783	6.698	7.564	2.590	5.385	40.449	275.355
DE FLOR:								
ALCACHOFA	110	14.616	--	14.726	4.037	11.372	--	166.662
COLIFROL	255	6.571	--	6.826	14.440	22.507	--	151.573
BRÓCOLI	--	23.025	--	23.025	--	15.478	--	356.387
RAICES Y BULBOS:								
AJO	1.035	13.815	--	14.850	5.807	9.450	--	136.561
Cebolla babosa	--	--	--	3.880	--	--	--	188.034
Cebolla medio grano o Liria	--	--	--	1.869	--	--	--	95.014
Cebolla grano o valenciana	--	--	--	11.173	--	--	--	597.170
Otras cebollas	--	--	--	4.843	--	--	--	597.170
CEBOLLA TOTAL	783	21.694	1	22.478	11.037	50.542	35.000	1.105.131
CEBOLLETA	54	1.065	1	1.120	12.991	29.726	28.500	32.388
PUERRO	138	2.378	13	2.529	12.707	32.528	12.915	79.274
REMOLACHA DE MESA	6	706	--	712	14.250	33.387	--	23.659
ZANAHORIA	115	8.035	7	8.157	10.287	52.660	--	424.311
RÁBANO	2	303	--	305	9.000	18.911	--	5.748
NABO	6	270	--	276	9.250	26.587	--	7.235
LEGUMINOSAS:								
JUDÍAS VERDES	207	5.942	2.708	8.857	6.989	16.412	16.740	144.301
GUISANTAS VERDES	227	12.931	130	13.288	2.781	6.292	11.846	83.530
HABAS VERDES	1.484	7.111	--	8.595	3.683	10.504	--	80.156
HORTALIZAS VARIAS:								
CHAMPIÑÓN (1)	--	--	45.624	45.624	--	--	2.655	121.138
SETAS (1)	--	--	9.350	9.350	--	--	1.271	11.880
OTRAS HORTALIZAS	661	14.066	184	14.911	5.821	18.719	33.587	273.332
TOTAL HORTALIZAS	20.461	275.140	66.346	363.729	--	--	--	13.148.152

Cuadro 3. Superficie total (ha) de hortalizas por provincias, según formas de cultivo en España. Año 2010 (MAGRAMA, 2011).

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie total (ha)			
	Secano	Regadío		Total
		Aire libre	Protegido	
La Coruña	3.327	1.774	662	5.763
Lugo	5.763	1.013	394	3.821
Orense	1.240	1.076	435	2.751
Pontevedra	655	1.615	700	2.970
GALICIA	7.638	5.478	2.191	15.305
PRINCIPADO DE ASTURIAS	622	110	88	820
CANTABRIA	94	--	1	95
Álava	21	574	53	648
Guipúzcoa	320	199	77	596
Vizcaya	628	442	133	1.023
PAÍS VASCO	969	1.215	263	2.447
NAVARRA	857	13.548	522	14.927
LA RIOJA	--	4.877	359	5.236
Huesca	11	3.434	--	3.445
Teruel	1	133	3	137
Zaragoza	209	5.561	53	5.823
ARAGÓN	221	9.128	56	9.405
Barcelona	221	3.369	106	3.696
Gerona	--	1.374	8	1.382
Lérida	30	1.011	1	1.042
Tarragona	16	4.717	10	4.743
CATALUÑA	267	10.471	125	10.863
BALEARES	121	2.140	243	2.504
Ávila	106	1.140	4	1.250
Burgos	31	530	8	569
León	--	423	23	446
Palencia	40	252	6	298
Salamanca	28	289	13	330
Segovia	3	3.357	--	3.360
Soria	37	243	--	280
Valladolid	205	5.020	10	5.235
Zamora	171	939	29	1.139
CASTILLA Y LEÓN	621	12.193	93	12.907
MADRID	104	849	103	1.056
Albacete	10	18.601	64	18.675
Ciudad Real	--	16.582	--	16.582
Cuenca	180	3.159	186	3.525
Guadalajara	--	762	--	762
Toledo	1.976	5.333	--	7.309
CASTILLA - LA MANCHA	2.166	44.437	250	46.853
Alicante	--	6.117	1.136	7.253
Castellón	3	5.177	61	5.671
Valencia	5	4.593	1.722	6.320
COMUNIDAD VALENCIANA	438	15.887	2.919	19.244
REGIÓN DE MURCIA	--	32.862	4.733	37.595
Badajoz	444	23.926	2.057	26.427
Cáceres	139	4.456	459	5.054
EXTREMADURA	583	28.382	2.516	31.481
Almería	--	10.538	37.575	48.113
Cádiz	326	11.100	135	11.561
Córdoba	883	8.202	536	9.621
Granada	1.003	14.150	2.351	17.504
Huelva	173	1.447	6.525	8.145
Jaén	136	3.096	--	3.232
Málaga	1.593	6.250	2.175	10.018
Sevilla	1.182	13.706	308	15.196
ANDALUCÍA	5.296	68.489	49.605	123.390
Las Palmas	409	20.99	1.492	4.000
S.C. de Tenerife	57	1.732	787	2.576
CANARIAS	466	3.831	2.279	6.576
ESPAÑA	20.461	253.897	66.346	340.704

